N° d'ordre au C.N.R.S.
AO 8406

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS - VII

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

par

DIVIES Charles

Sujet de la thèse : Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques.

présentée et soutenue le 4 Mai 1973.

MM. J. TAVLITZKI	Professeur à l'Université de PARIS - VII Président
J.-P. AUBERT	Professeur à l'Université de PARIS - VII Rapporteur
P. SCHAEFFER	Professeur à l'Université de PARIS - SUD Examinateur

N° d'ordre au C.N.R.S.
AO 8406

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS - VII

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

par

DIVIES Charles

Sujet de la thèse : Contribution à l'étude de la production d'acide acétique et du métabolisme de l'éthanol par les bactéries acétiques.

présentée et soutenue le 4 Mai 1973.

MM. J. TAVLITZKI	Professeur à l'Université de PARIS - VII Président
J.-P. AUBERT	Professeur à l'Université de PARIS - VII Rapporteur
P. SCHAEFFER	Professeur à l'Université de PARIS - SUD Examinateur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MA FEMME

A MES ENFANTS

A MA FAMILLE

A MES MAÎTRES

Ce travail a été effectué à la Station de Technologie des Produits Végétaux du Centre de Recherches de l'Institut National de la Recherche Agronomique de DIJON. Je remercie profondément mes directeurs, Monsieur BARRET, Monsieur DUPUY et Monsieur BIDAN d'en avoir permis la réalisation.

Je remercie Monsieur le Professeur TAVLITZKI de m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Monsieur le Professeur SCHAEFFER a bien voulu me faire l'honneur de participer au jury. Qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude.

J'exprime à Monsieur le Professeur AUBERT, qui a bien voulu accepter la charge d'être le rapporteur de ce travail, mes remerciements respectueux.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur DUPUY, Directeur de Recherches, pour tous les enseignements qu'il a bien voulu me prodiguer.

Ma reconnaissance s'adresse aussi à Monsieur Charles SCHNEIDER qui a bien voulu m'aider pour la réalisation des expériences.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

Description des bactéries acétiques p. 2
a) Caractères
b) Classification

CHAPITRE I - MATERIEL ET METHODES p. 4

A/ Matériel biologique p. 4

B/ Conditions de culture p. 5

1° - Milieu de culture
2° - Conditions de culture

C/ La préparation et l'utilisation des bactéries non proliférantes p. 11

D/ Techniques enzymologiques p. 11

1° - Préparation des extraits partiellement purifiés
2° - Méthodes électrophorétiques
3° - Mesure des activités enzymatiques

E/ Mesure de la radioactivité p. 23

F/ Méthodes chimiques utilisées pour le dosage des produits du métabolisme p. 25

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549212_0008

CHAPITRE II - CINETIQUE DE LA PRODUCTION D'ACIDE ACETIQUE

A/ *Production réalisée par A. xylinum* p. 28

1° - Conditions de culture
2° - Etude de la croissance et de la production d'acide acétique
3° - Discussion et conclusion

B/ *Etude de la production d'acide acétique par A. mesoxydans cultivé en culture continue* p. 39

1° - Etude nutritionnelle
2° - Culture continue d'A. *mesoxydans* p. 41
a) Cas où l'éthanol représente le facteur nutritif limitant p. 42
b) Cas où l'éthanol n'est pas le facteur nutritif limitant p. 48
c) Analyse des états d'équilibre obtenus lorsque l'éthanol n'est pas le facteur nutritif limitant p. 49
3° - Discussion et conclusion

CHAPITRE III - ETUDE DU MECANISME DE LA PRODUCTION D'ACIDE ACETIQUE

A/ *Résultats acquis antérieurement* p. 69

I - Difficulté de l'étude des enzymes chez les *Acetobacter*
II - Les alcool et acétaldéhyde-déshydrogénases des bactéries acétiques p. 71
1) Les alcool et acétaldéhyde-déshydrogénases liées au NAD et au NADP
2) Les alcool et acétaldéhyde-déshydrogénases particulaires

III - Les alcool et acétaldéhyde déshydrogénases chez d'autres espèces p. 76

B/ *Résultats expérimentaux* p. 78

I - Etude de l'oxydation de l'éthanol par les enzymes particulaires d'A. *rancens* p. 78

II - Cinétique d'oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde par A. *mesoxydans* p. 86

III - Action du substrat carboné sur l'oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde par A. *aceti* p.101

IV - Mise en évidence de plusieurs alcool déshydrogénases liées respectivement au NAD et au NADP chez A. *mesoxydans* p.110

CHAPITRE IV - *CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'OXYDATION DE L'ACETATE CHEZ A. rancens* p.114

A/ *Résultats acquis antérieurement* p.115

1° - Oxydation de l'acétate, les cycles T.C.A. et glyoxylique chez les microorganismes autres que les bactéries acétiques p.115

2° - Les études des cycles T.C.A. et glyoxylique chez les bactéries acétiques p.120

B/ *Résultats expérimentaux* p.122

1° - Métabolisme de l'acétate pendant la culture avec l'éthanol comme premier substrat carboné p.122

2° - Oxydation de l'acétate par les cellules non proliférantes p.128

a) Bactéries cultivées sur d'autres substrats carbonés que l'éthanol

b) Bactéries cultivées sur éthanol

3° - Etude enzymatique p.132

4° - Inhibition de l'oxydation de l'acétate par l'éthanol p.139

RESUME p.147

BIBLIOGRAPHIE p.150

I N T R O D U C T I O N

L'étude qui suit a été entreprise afin d'approfondir nos connaissances sur le métabolisme de l'éthanol chez les bactéries acétiques.

Ces bactéries se développent généralement dans les milieux contenant de l'éthanol, ainsi elles peuvent provoquer des accidents au cours de la fabrication des principales boissons alcoolisées que nous consommons (vins, bières, cidres...). Elles sont alors notamment responsables de la production d'acide acétique à partir de l'éthanol, selon la réaction

Ethanol + oxygène ⟶ acide acétique + eau.

Comme nous le verrons par la suite, les bactéries acétiques peuvent oxyder l'éthanol avec une remarquable intensité, HROMATKA et al (1950) ont montré qu'au cours de la production d'acide acétique en culture submergée, on pouvait obtenir une consommation d'oxygène de l'ordre de 7 750 cm^3 d'oxygène par gramme de poids sec de bactéries et par heure. Cette remarquable étude, à l'origine de l'introduction d'une technique nouvelle en vinaigrerie, avait été effectuée avec une flore non contrôlée. Nous avons pensé réaliser le production d'acide acétique avec une souche isolée en vinaigrerie afin d'en étudier la cinétique de manière plus complète. Cette étude constituera la première partie de notre travail. Nous essayerons de dégager les enseignements pratiques qui pourront être mis en évidence par une connaissance plus précise du phénomène.

La deuxième partie traitera du mécanisme de la production d'acide acétique. Nous avons tenté de répondre aux questions que l'on se pose à propos des enzymes responsables de cette transformation. Doit-on considérer que la réaction de transformation de l'éthanol en acide acétique effectuée par les enzymes particulaires se fait en une ou deux étapes ?

Les enzymes responsables de la "fermentation" sont-elles des enzymes constitutives ?

En troisième et dernière partie, nous examinerons le problème de l'oxydation de l'acide acétique. On a constaté que les bactéries acétiques oxydent l'éthanol en acide acétique et accumulent, presque intégralement, ce dernier dans le milieu de culture, alors qu'elles sont capables de l'oxyder lorsque l'alcool a complètement disparu. Ce phénomène signalé pour la première fois par PASTEUR (1868) n'a pas encore reçu d'explication.

Description des bactéries acétiques

a) Caractères

Les bactéries acétiques représentent un groupe bactérien fortement individualisé. Elles sont classées dans la famille des Pseudomonadacées. Ce sont des microorganismes aérobies stricts, gram négatif, de forme ovoïde et qui ont la faculté d'oxyder en milieu acide, l'éthanol en acide acétique.

Comme le fait remarquer STANIER (1947) les *Pseudomonas* sont aussi capables d'effectuer la même oxydation ; ce qui différencie surtout les bactéries acétiques c'est le fait qu'elles peuvent effectuer cette réaction à des pH beaucoup plus bas ; les *Pseudomonas* meurent en effet à un pH inférieur à 5.

b) Classification

Les premiers essais de classification tenaient surtout compte de l'origine des *Acetobacter*. VISSER'T HOOFT (1925) fut le premier à donner une classification basée sur les critères biochimiques : présence de catalase, assimilation de l'azote ammoniacal, oxydation du glucose, oxydation de l'alcool, oxydation de l'acide acétique.

ASAI (1934,1935) propose la distinction de deux genres, *Acetobacter* et *Gluconobacter*, le premier oxydant et assimilant l'acide acétique, le second n'oxydant ni n'assimilant l'acide acétique et donnant surtout de l'acide gluconique à partir du glucose.

FRATEUR (1950) propose, pour la détermination des espèces, des critères biochimiques permettant de distinguer quatre groupes de bactéries acétiques : les suboxydans qui n'oxydent pas l'acide acétique, les mesoxydans comprenant les espèces qui ont tous les caractères biochimiques potentiels des *Acetobacter*, les oxydans qui n'ont pas de pouvoir cétogène, les peroxydans qui n'oxydent pas le glucose et n'ont pas de catalase. Cet important travail reste la base de la détermination des bactéries acétiques.

LEIFSON (1954) signale que le groupe *Gluconobacter* qui a des flagelles polaires pourrait être l'espèce qui dériverait directement des *Pseudomonas*, alors que les *Acetobacter* en seraient plus éloignés puisqu'ils ont des flagelles péritriches. Ainsi, la justification de la différentiation des bactéries acétiques en 2 genres *Acetobacter* et *Gluconobacter* apparaît justifiée (ASAI, 1968).

Plusieurs schémas de la phylogénie des bactéries acétiques ont été proposés, DE LEY (1961), JANKE (1962). ASAI (1968) a fait une analyse détaillée de ces différentes études.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

A/ MATERIEL BILOGIQUE

Les expériences ont été réalisées avec différentes souches de bactéries acétiques.

- *Acetobacter aceti* NCI B 8554 nous a été fournie par le Professeur ETTLINGER (Microbiol. Inst. Zürich)

- *Acetobacter xylinum* utilisé, provient du"fermenteur" d'une vinaigrerie de même qu'*Acetobacter mesoxydans* Nous avons personnellement isolé et identifié ces bactéries selon la classification proposée par FRATEUR (1950).

- *Acetobacter rancens* B. 291 a été isolée d'un cidre doux (MAUGENET 1962).

La conservation de ces souches est effectuée de deux manières.

Elles sont conservées par repiquage sur milieu solide contenant :

- cidre doux	500 ml
- eau désionisée	500 ml
- extrait de levure (Difco)	1,2 g
- $(NH_4)_3PO_4$	2 g
- gélose	20 g

Ce milieu que nous utilisons par la suite est appelé milieu G_2 avec la mention liquide ou gélosé.

Le repiquage des différentes souches a lieu toutes les 4 semaines.

Les milieux gélosés inclinés, après ensemmencement à partir d'un tube G_2 liquide, sont incubées 3 jours à 28°C, puis conservées au réfrigérateur jusqu'au prochain repiquage.

L'autre moyen de conservation que nous avons adopté afin d'avoir une autre référence est la lyophilisation.

Pour ce faire, les cellules sont récoltées en phase stationnaire dans leur milieu de croissance. Après lavage à l'eau physiologique, les bactéries sont mises en suspension à raison de 10^{10} cellules/ml, dans un milieu de protection qui a pour composition :

- sérum de Poulain	50 ml
- glucose	5 g
- Bacto-peptone (Difco)	0,136 g
- Bacto-beef (Difco)	0,084 g
- eau distillée	17 ml

La lyophilisation proprement dite est effectuée avec le lyophilisateur "Speedi-Vac gauge" Modèle B 5 de Edwards High Vacuum Ltd.

B/ CONDITIONS DE CULTURE

1° - Milieu de culture

La stérilisation des milieux est faite à 110°C pendant 20 mn. Les substrats carbonés, éthanol, acide

acétique, acide lactique qui sont déjà stériles sous forme commerciale sont ajoutés après stérilisation.

Pour *Acetobacter aceti* le milieu de culture de base est identique au milieu utilisé par MONARD et al (1967) tampon phtalate à pH 5,5 ($COOH - C_6H_4 - COOK$ / NaOH = 0,05 M) ; sels minéraux, identiques pour tous les milieux :

KH_2PO_4 0,5 g/l ; K_2HPO_4, 3 H_2O 0,5 g/l ; $MgSO_4$, 7 H_2O 0,2 g/l ; $FeSO_4$, 7 H_2O 0,01 g/l ; $MnSO_4$, 4 H_2O 0,01 g/l ; NaCl 0,01 g/l ; $(NH_4)_2SO_4$ 10 g/l.

Les différentes sources de carbone utilisées sont :

a) éthanol 0,08 M
b) acide acétique 0,08 M
c) acide lactique 0,08 M
d) glucose 0,08 M
et alanine 0,08 M
Le glucose est stérilisé séparément, l'alanine est stérilisé avec le milieu de base.

Pour *Acetobacter rancens* B 291, le milieu de culture de base à la composition suivante :

- KH_2PO_4 13,6 g
- $(NH_4)_2SO_4$ 2 g
- solution minérale de Skeggs et Wright 5 ml
- extrait de levure (Difco) 1 g
- eau q. s. pour 1 litre.

La solution de Skeggs et Wright contient :

- $MgSO_4$, 7 H_2O 40 g
- $MnSO_4$, 4 H_2O 2 g
- $FeCl_3$ 0,4 g
- HCl pur 1 ml
- eau q. s. pour 1 litre.

Pour les expériences effectuées en fermenteur avec un pHstat le milieu de base contient 2 g/l de KH_2PO_4. Les substrats carbonés stériles sont ajoutés après la stérilisation du milieu de base.

Pour *Acetobacter xylinum* et *Acetobacter meso-xydans*, le milieu de culture a la composition suivante :

- extrait de levure (Difco) 0,5 g
- $(NH_4)_2H\ PO_4$ 0,3 g
- solution de Skeggs et Wright 5 ml
- eau q. s. pour 1 litre.

Le glucose, à raison de 2 g/l, stérilisé à part, est ajouté après stérilisation. Le développement de ces cultures demande un autre substrat carboné tel que l'éthanol ou l'acétate avec le glucose.

Le lactate de calcium à la dose de 3,1 g/l peut remplacer le glucose.

Nous avons appelé milieu minéral le milieu sans extrait de levure.

Dans certaines expériences qui ont pour but l'obtention d'extraits enzymatiques pour des mesures de cinétique, nous avons choisi le milieu proposé par DUPUY et MAUGENET (1962) qui a pour base :

- extrait de levure (Difco) 3 g
- extrait de viande (Difco) 3 g
- solution de Skeggs et Wright 5 ml
- KH_2PO_4 2 g
- eau q. s. pour 1 litre.

Les substrats carbonés, glucose et éthanol, sont ajoutés après stérilisation.

2° - Conditions de culture

Les cultures sont réalisées dans différentes conditions. Pour les cultures dont le volume n'excède pas 800 ml et qui n'ont pas des teneurs en éthanol ou acétate supérieures à 3%, nous utilisons des fioles remplies au 1/10 de leur volume environ par le milieu de culture. Ces fioles sont placées sur un agitateur rotatif tournant à 240 tours/mn. Dans ces conditions selon la forme de la fiole et sa contenance, l'aération mesurée par une solution de sulfite selon la technique de SCHULTZ et GADEM (1956) varie de 38 mmoles d'O_2 par litre et par heure à 50 mmoles d'O_2 par litre et par heure.

La température de la salle des cultures est de 28°C. Le pH du milieu est maintenu constant au cours de la culture par des additions de NaOH ou de H_2SO_4 10 N.

Pour les cultures demandant un plus grand volume, nous utilisons un fermenteur de 20 litres muni d'un système de régulation de la température et d'un pHstat. L'aération est maintenue à 120 mmoles d'O_2 par litre et par heure, la température à 28°C. Nous avons adapté sur ce fermenteur un prélèvement continu d'échantillons par l'intermédiaire d'une pompe "Ismatec" avec un débit de 0,38 ml/mn. Les échantillons sont recueillis dans un collecteur de fraction. Les tubes du collecteur contiennent deux gouttes de $HgCl_2$(1 %). Par cette méthode les échantillons sont stabilisés.

Les études que nous avons effectuées sur la "fermentation" acétique avec les souches isolées en vinaigrerie sont conduites dans des colonnes en verre d'un diamètre de 6 cm et d'une hauteur utile de 1m. La partie inférieure de ces colonnes est fermée par une plaque de verre fritté

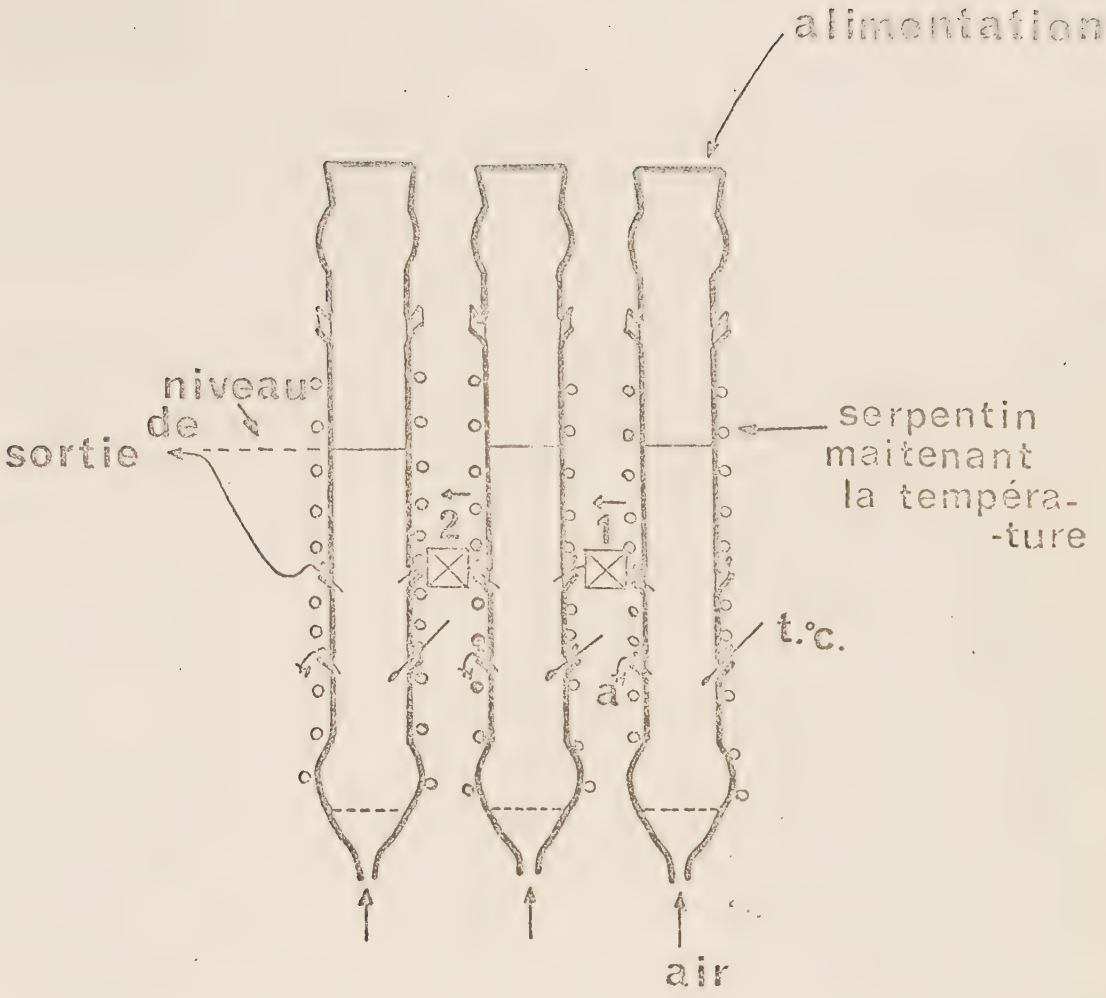

Fig. 1 : *Schéma des réacteurs utilisés pour l'étude de la "fermentation" acétique.*

a, orifice de prélèvement

1 et 2 : électrovannes

de porosité 3. De l'air forcé à travers cette plaque permet de fournir l'oxygène nécessaire et d'homogénéiser la culture d'autant plus que la base de ces colonnes crée un courant de convection. Pour un débit d'air de 1,6 l/mn, l'aération à 30°C pour un volume de milieu de 1,5 l, est de 300 mmoles d'O_2 par litre et par heure. La mesure est effectuée par la technique de SCHULTZ et GADEN (1956).

Nous représentons (figure 1) le schéma de trois colonnes disposées pour une culture en continu. L'alimentation est effectuée par une pompe, la sortie du liquide transformé se fait par gravité. On remarquera que ce couplage permet de faire varier de 1 à 3 le taux de dilution. La hauteur du liquide à l'intérieur des colonnes est fixé par le siphon de sortie. Pour éviter le mélange des 3 réacteurs, la commande des électrovannes 1 et 2 est successive. Par ce système de transfert par gravité en étapes successives, on évite le séjour des bactéries sans aération. Nous savons depuis les travaux de HROMATKA et al (1950) que quelques secondes dans l'arrêt de l'aération suffisent pour entraîner l'arrêt définitif de la transformation lorsque le degré total, acide acétique plus éthanol, est de l'ordre de 9,5°. Notons qu'en vinaigrerie, 1 degré d'alcool correspond à 1 % du volume en éthanol, 1 degré d'acide acétique correspond à 1 % du poids en acide acétique.

Dans ces colonnes on peut prélever les bactéries sans les priver d'oxygène. En présence d'une forte concentration d'acide acétique ou d'éthanol, il suffit de laisser le liquide en transformation s'écouler par l'orifice a et de recueillir 1 ml de liquide aéré dans 10 ml d'eau physiologique ou de milieu G_2 liquide.

C/ LA PREPARATION ET L'UTILISATION DES CELLULES NON PROLIFERANTES

Lorsque la teneur en acide acétique ou en éthanol ne dépasse pas 2 %, nous avons centrifugé à 0°C pendant 15 mn à 4 000 g les suspensions cellulaires qui sont ensuite lavées deux fois à l'eau physiologique refroidie aux environ de 0°C. Les mesures de leur respiration par la technique manométrique de WARBURG (UMBREIT et al, 1949) ou par un respiromètre GILSON sont effectuées généralement dans l'heure suivant la récolte. Cette précision est importante pour les mesures d'oxydation de l'acétate car la faculté des cellules non proliférantes d'oxyder ce substrat se perd au bout de quelques heures (DUPUY, 1958, b).

Les déterminations du poids sec des suspensions bactériennes sont effectuées par turbidimétrie à la longueur d'onde de 575 nm après avoir établi la correspondance densité optique - poids sec.

Lorsque la teneur en éthanol ou en acide acétique dépasse 2 %, pour éviter la détérioration des cellules par manque d'oxygène, nous avons dilué le milieu à centrifuger de 5 à 10 fois avant centrifugation.

D/ TECHNIQUES ENZYMOLOGIQUES

Lors de leur lavage les cellules d'*Acetobacter* sont mises en supension dans un tampon phosphate 0,01 M de pH 6,5 à 7. Les extraits cellulaires sont généralement obtenus en soumettant les cellules aux ultra-sons (3 g de cellules en poids sec dans 100 ml de tampon). Pour ce faire, nous utilisons un appareil Siduse type US 77, travaillant au maximum de sa puissance. Le traitement dure 3 fois 4 minutes espacées par un arrêt de 1 mn. La température est maintenue aux environs de 5°C.

L'extrait total obtenu est centrifugé à 0°C pendant 20 mn à 8 000 g. Le liquide surnageant qui constitue l'extrait brut comprenant les débris cellulaires et les protéines solubles est conservé à 0°C.

L'extrait brut est ensuite centrifugé à 0°C dans une ultra-centrifugeuse préparative pendant 2 heures à 105 000 g. Le culot des particules d'aspect gélatineux est remis en suspension dans un tampon phosphate 0,01 M à pH 7. Nous appelons cet extrait, extrait particulaire, le surnageant est nommé extrait soluble.

1° - *Préparation des extraits partiellement purifiés*

Afin d'éliminer les acides nucléiques, on ajoute à l'extrait soluble une solution de $MnCl_2$ 1 M à raison de 2,5 ml pour 50 ml de solution. Après 30 mn, le précipité est séparé par centrifugation à 10 000 g pendant 15 mn.

La solution de protéine est ensuite généralement concentrée par précipitation avec $(NH_4)_2SO_4$ à 80 % de saturation. L'adjonction de $(NH_4)_2SO_4$ est toujours effectuée progressivement pendant 15 mn. 30 mn après la solubilisation du $(NH_4)_2SO_4$, on effectue une centrifugation à 10 000 g pendant 15 mn. Le culot est repris dans un tampon phosphate 0,01 M pH 7. Les sels sont éliminés par passage sur une colonne de Sephadex G 25 préalablement équilibrée avec le tampon phosphate 0,01 M pH 7.

Les protéines peuvent ensuite être fixées sur une colonne de DEAE cellulose (DEAE - SS Serva de capacité 0,62) conditionnée selon les indications de KERSTERS et de LEY (1966,a, b) et placée en chambre froide à la température de 4°C. Généralement, on opère avec une colonne de 4,7 cm^2 x 28 cm. L'alimentation de la colonne est réalisée

par une pompe "Ismatec" avec un débit de 0,8 ml/mn. Les différentes fractions sont collectées par fraction de 6 ml.

L'élution proprement dite est réalisée par un gradient exponentiel continu de NaCl dans 0,02 M de tampon phosphate pH 7. Le vase de mélange contient 200 ml de solution saline 0,05 M, et le vase d'alimentation, 800 ml de solution saline 0,5 M.

Les détails complémentaires pour la préparation des extraits enzymatiques seront donnés au cours de la rédaction des chapitres les concernant.

2° - *Méthode électrophorétique*

Différentes activités enzymatiques ont été analysées sur les différents extraits enzymatiques par électrophorèse sur gel d'acrylamide selon le procédé d'ORNSTEIN et DAVIS et décrit par DAVIS (1964). Le générateur de tension est un "Pleuger" Vo-300 qui débite de 0 à 250 mA sous 0 à 300 v, il est couplé à une enceinte "Acrylophor 140 Pleuger".

Nous utilisons un gel d'acrylamide à 8,5 %, la polymérisation du gel se fait en présence de persulfate. Les échantillons (mélange de 1 ml d'échantillon pour 9 ml de saccharose à 25 %) sont directement introduits à la surface des gels à l'aide d'une micro-seringue Hamilton de 50 µl.

La séparation à lieu à 5°C, les protéines migrant sous ampérage constant : 2 mA par tube pendant 30 mn et 4 mA par tube pour la séparation proprement dite qui dure 2 heures. Le front de migration est suivi par l'intermédiaire du bleu de bromophénol. On ajoute pour cela quelques gouttes

d'une solution de bleu de bromophénol à 1 °/₀₀ au tampon de séparation.

Le tampon de séparation tris-glycine pH 8,3 a la composition suivante :

- trishydroxyméthylaminométhane 6 g
- glycine 28,8 g
- eau distillée q. s. pour 1 litre.

Le pH est ajusté à 8,3 par HCl.

Avant utilisation, le tampon est dilué 6,5 fois dans de l'eau bi-distillée.

Après migration, la révélation des différentes activités enzymatiques, se fait à la température ambiante du laboratoire à l'abri de la lumière pendant 30 mn environ. Les solutions de révélation pour les déshydrogénases essayées comprennent comme solution de base :

- phenazine methosulfate (PMS) 7 mg
- nitrobleu de chlorure de tetrazolium (NBT) 50 mg
- coenzyme NAD ou NADP 20 mg
- tampon tris-HCl 0,1 M pH 8,6 100 ml

Pour la révélation des alcool ou acétaldehyde-déshydrogénases on ajoute respectivement 2,8 ml d'éthanol ou d'acétaldehyde 0,5 M.

Pour la révélation des isocitrate - déshydrogénases, on ajoute 20 mg de $MgCl_2$ et 80 mg de DL - isocitrate.

3° - *Mesure des activités enzymatiques*

La teneur en protéines des extraits étudiés a été calculée de différentes façons.

Lorsque la teneur en acides nucléiques n'excède pas 20 %, le dosage est effectué selon la technique de WARBURG et CHRISTIAN (LAYNE, 1957).

L'azote total dans les cas défavorables est déterminé par la technique de LUBOCHINSKY et al (1954). La teneur en protéines est estimée à 6,25 fois la teneur en azote.

Enfin, pour des raisons pratiques, nous avons aussi utilisé la méthode de LOWRY et al (1951) en prenant comme standard de la sérum albumine bovine cristallisée.

Les activités enzymatiques elles-mêmes ont été exprimées de différentes manières :

- les mesures se ramenant à une consommation d'oxygène ou un dégagement de gaz carbonique sont généralement exprimées en µl de gaz consommé ou dégagé par heure et par mg de protéines ;

- les mesures se ramenant à des lectures de densité optique sont exprimées par des différences de densité optique par unité de temps et par mg de protéines, ou bien en µmoles de produits transformés par heure et par mg de protéines.

On trouvera ci-dessous la technique utilisée pour chaque enzyme. Les remarques concernant quelques dosages enzymatiques seront faites lorsque le problème particulier sera abordé.

Les mesures ont été effectuées en ce qui concerne les lectures par densité optique au spectrophotomètre Bausch et Lomb spectronic 20 et au spectrophotomètre enregistreur Cary Modèle 15.

- *Détermination de l'acéto-CoA synthétase* (EC 6 2 1 1)

Cette enzyme catalyse la réaction :

Acétate + A T P + Co A ⇌ Acétyl-Co A + 5-AMP+PP

Selon JONES et LIPMAN (1955) la réaction est effectuée en présence d'hydroxylamine, il y a formation d'acétohydroxamate avec libération de Co A. L'acétohydroxamate est coloré ensuite par une solution de $FeCl_3$.

Composition du mélange réactionnel

Co A à la dose de 2 mg/ml	0,3 ml
ATP 0,1 M	0,05 ml
Acétate de potassium 0,2 M	0,1 ml
Tampon tris- 1 M à pH 8	0,1 ml
$MgCl_2$ 0,05 M	0,05 ml
Glutathion 0,1 M	0,05 ml
Hydroxylamine 2 M à pH 7,5	0,3 ml
Extrait bactérien	0,4 ml

La réaction est effectuée pendant 30 mn à 30°C, la révélation est effectuée en ajoutant successivement 0,1 ml d'HCl pur et 2,3 ml d'une solution contenant 10 % de $FeCl_3$, 6 H_2O et 3,3 % d'acide trichloroacétique dans 0,66 N HCl. Après centrifugation, la lecture est effectuée à 540 nm. Un blanc sans Co A est mesuré dans tous les cas.

L'activité spécifique est exprimée en µmoles d'acétohydroxamate formées par heure et par mg de protéines.

- *Détermination de la citrate synthétase* (EC 4 1 3 7)

Réaction :

Acétyl - CoA + oxaloacétate^{2-} + H_2O ⇌ Citrate^{3-} + CoA SH+H^+

Selon WEITZMAN (1969) on suit la formation de CoA à l'aide de l'acide 5,5' -dithiobis 2-nitrobenzoïque

(D.T.N.B.) à la longueur d'onde de 412 nm.

Composition du mélange réactionnel

Tampon tris 0,1 M pH 8	1 ml
Acetyl CoA - 10 mg dans 1,2 ml d'eau	0,020 ml
D.T.N.B. - 10^{-2} M à pH 8	0,04 ml
Extrait enzymatique	0,02 ml
Oxaloacétate - 10^{-2}M	0,1 ml

Par suite de la présence de déacylase dans certains extraits, la cuve de référence contient tous les éléments de la réaction à l'exception de l'oxaloacétate.

Le coefficient molaire d'extinction de l'ion mercaptol formé utilisé pour le calcul de l'activité spécifique est de :

$K = 13\ 600\ cm^2/nmoles$

$$(K = \frac{d.o.}{d \times c} = \frac{1}{cm} \times \frac{nmoles}{cm^3} = cm^2/nmoles)$$

- *Détermination de l'aconitase* (EC 4.2.1.3.)

Réaction :

Citrate $\rightleftharpoons$ cis-aconitate $\rightleftharpoons$ isocitrate

Selon FANSLER et LOWENSTEIN (1969), le cis-aconitate formé est suivi à 240 nm, le coefficient molaire d'extinction utilisé pour le calcul de l'activité spécifique est de 4 880 $cm^2/nmoles$.

Composition du mélange réactionnel

Tampon phosphate 0,1 M à pH 7	1 ml
Citrate 0,1 M	0,1 ml
Extrait enzymatique	0,02 ml

- *Détermination de la fumarase* (EC 4.2.1.2.)

Réaction :

L-malate $\rightleftharpoons$ fumarate + H_2O

Selon HANSON et COX (1967) le fumarate formé est suivi à 240 nm, le coefficient molaire d'extinction utilisé

pour le calcul de l'activité spécifique est de 2 570 cm^2/mmoles.

Composition du mélange réactionnel

Tampon tris	0,1 M à pH 7,5	1 ml
DL malate	0,1 M	0,1 ml
Extrait enzymatique		0,02 ml

Détermination de l'isocitrate déshydrogénase liée au NAD (EC 1.1.1.4.1.) et de l'isocitrate déshydrogénase liée au NADP (EC 1.1.1.4.2.)

Réactions :

$$\text{Threo-Ds-isocitrate} + \begin{matrix}NAD^+\\ou\\NADP^+\end{matrix} \xrightleftharpoons{Mg^{++}} \text{x(-cétoglutarate} + CO_2 + \begin{matrix}NADH\\ou\\NADPH\end{matrix} + H$$

Les extraits enzymatiques d'*A. rancens* possèdent une activité isocitrate déshydrogénase liée au NAD et une activité isocitrate déshydrogénase liée au NADP. Ces deux activités sont aisément détectables et différenciables par électrophorèses sur gel d'acrylamide.

Les isocitrate déshydrogénases sont activées par le $MgCl_2$. Les extraits bruts contiennent une activité $NADH_2$ oxydase qui est inhibée en présence de KCN.

Mélange réactionnel de mesure de l'isocitrate déshydrogénase liée au NAD

Tampon phosphate 0,1 M à pH 7	1 ml
KCN 0,1 M	0,1 ml
NAD à 5 mg/ml	0,1 ml
$MgCl_2$ 0,05 M	0,05 ml
Isocitrate (10 mg/ml)	0,1 ml
Extrait enzymatique	0,05 ml

Mélange réactionnel de mesure de l'isocitrate déshydrogénase liée au NADP

Tampon tris 0,1 M à pH 8,6	2,5 ml
NADP à 5 mg/ml	0,1 ml
$MgCl_2$ 0,05 M	0,05 ml
Isocitrate (10 mg/ml)	0,1 ml
Extrait enzymatique	0,02 ml

Le coefficient d'extinction molaire du NADH et du NADPH utilisé pour les calculs des activités spécifiques est de 6 220 cm^2/nmoles.

Comme nous le constaterons par la suite (fig. 38) il y a une nette différence d'activité pour l'isocitrate déshydrogénase liée au NAD, entre le tampon tris et le tampon phosphate. Il apparaît que le pH optimum dans le tampon phosphate se situe à pH 7 alors que pour le tampon tris cet optimum est beaucoup plus large. A pH 10 on obtient un nouveau maximum qui, comme nous le verrons par la suite est plus ou moins prononcé selon le stade de prélèvement des cellules au cours de leur croissance sur éthanol.

En ce qui concerne l'isocitrate déshydrogénase, liée au NADP, le pH optimum est aussi beaucoup plus large en présence de tampon tris.

- *Détermination de la succinate déshydrogénase* (EC 1.2.3.99.1

Selon VEEGER et al (1969) la succinate deshydrogénase est mesurée en adoptant le mélange réactionnel suivant :

Tampon phosphate 0,1 M à pH 7	2 ml
Ferricyanure de potassium 0,02 M	0,1 ml
KCN 0,1 M	0,1 ml
Succinate 0,2 M	0,2 ml
Extrait enzymatique	0,2 ml

Pour le calcul de l'activité spécifique on a choisi après BENZIMANN (1969, b) le coefficient d'extinction du ferricyanure égal à 1200 cm^2/nmoles à la longueur d'onde de 400 nm.

Au cours de la réaction, une mole de succinate réduit 2 moles de ferricyanure.

- *Détermination de la malate deshydrogénase liée au NAD*

Réaction :

L-malate ⟶ oxaloacétate + 2 H^+ + 2 e

Cette enzyme a été étudiée chez *A. xylinum* par BENZIMANN (1969, b). On peut déterminer son activité spécifique en présence de ferricyanure à la longueur d'onde de 400 nm. Au cours de la réaction une mole de L-malate réduit deux moles de ferricyanure.

Le mélange réactionnel comprend :	
Tampon phosphate 0,1 M à pH 7	2 ml
DL-malate 0,2 M	0,2 ml
KCN 0,1 M	0,1 ml
KCl 0,1 M	0,1 ml
Ferricyanure de potassium 0,02 M	0,1 ml
Extrait enzymatique	0,2 ml

- *Détermination de l'α-cétoglutarate déshydrogénase et de la pyruvate déshydrogénase*

En présence de ferricyanure de potassium on a selon REED et WILLMS (1969) les réactions suivantes :

$$\underset{\text{ou pyruvate}}{\alpha\text{-cétoglutarate}} + 2\ Fe(CN)_6^{-3} + H_2O \longrightarrow \underset{\text{acétate}}{\text{succinate ou}} + CO_2 + 2\ Fe(CN_6)^{-4} + H^+$$

Le mélange réactionnel comprend :	
Tampon phosphate 0,1 M à pH 7	2 ml
Ferricyanure de potassium 0,02 M	0,1 ml
α-cétoglutarate ou pyruvate 0,2 M à pH 7	0,2 ml
Thiamine pyrophosphate 0,02 M	0,1 ml
Extrait enzymatique	0,2 ml

- *Détermination de l'isocitratase* (EC 4.1.3.1)

Réaction :

$$\text{Treo - Ds - isocitrate}^{3-} \xrightleftharpoons{Mg^{++}} \text{Glyoxylate}^{-} + \text{succinate}^{2-}$$

Le glyoxylate formé est détecté par la semicarbazide selon STOUTHAMER et al (1963). A la longueur d'onde de 252 nm, le coefficient d'extinction molaire du produit formé est de 12 400 cm^2/mmoles.

Le mélange réactionnel comprend :

Tampon phosphate 0,1 M à pH 7	1 ml
Semicarbazide 0,1 M	0,1 ml
$MgCl_2$ 0,05 M	0,05 ml
Isocitrate (10 mg/ml)	0,1 ml
Extrait enzymatique	0,02 ml

- *Détermination de la malate synthétase* (EC 4.1.3.2)

Réaction :

$$\text{Acétyl-CoA + glyoxylate}^{-} + H_2O \rightarrow \text{Malate + CoA + } H^{+}$$

Selon DIXON et KORNBERG (1962) on suit la disparition d'acétyl-CoA à 232 nm. Le coefficient d'extinction moléculaire est de 4 500 cm^2/mmoles.

Le mélange réactionnel comprend :

Tampon tris 0,1 M à pH 8	1 ml
Acétyl-CoA (10 mg/1,2 ml)	0,02 ml
Glyoxylate 0,1 M	0,1 ml
Extrait enzymatique	0,04 ml

- *Mesure de l'activité des éthanol et acétaldehyde déshydrogénases*

- *Ethanol et acétaldehyde déshydrogénases particulaires*

Les mesures sur les extraits particulaires sont

effectuées par la méthode manométrique de Warburg.

Dans ce cas, les réactions globales sont:

$$CH_3 - CH_2OH + O_2 \longrightarrow CH_3 - COOH + H_2O$$

$$CH_3 - CHO + 1/2\ O_2 \longrightarrow CH_3 - COOH$$

En général, le mélange réactionnel comprend :

Tampon phosphate 0,2 M	1 ml
Extrait particulaire	0,5 ml
Ethanol ou acétaldehyde à différentes concentrations	0,5 ml

Nous spécifions dans le texte les concentrations d'éthanol et d'acétaldehyde utilisées ainsi que le pH de l'expérience.

Les mesures sur les éthanol et acétaldehyde-déshydrogénases particulaires ont été aussi effectuées en suivant la diminution de densité optique à 400 nm de ferricyanure, selon les indications de NAKAYAMA (1961, a, b).

Dans ce cas, le mélange réactionnel comprend :

Tampon phosphate 0,05 M pH 5 ou pH 6	3 ml
Ferricyanure de potassium 0,02 M	0,1 ml
Ethanol ou acétaldehyde à différentes concentrations	0,1 ml
Extrait particulaire	0,1 ml

- *Ethanol et acétaldehyde déshydrogénases solubles*

Ces enzymes sont mesurées sur l'extrait enzymatique soluble.

Les réactions étudiées répondent aux équations :

$$CH_3 - CH_2OH + \begin{matrix} NAD^+ \\ \text{ou} \\ NADP \end{matrix} \rightleftharpoons CH_3 - CHO + \begin{matrix} NADH \\ \text{ou} \\ NADPH \end{matrix} + H^+$$

$$CH_3 - CHO + \begin{matrix} NAD^+ \\ \text{ou} \\ NADP^+ \end{matrix} + H_2O \rightleftharpoons CH_3 - COOH + \begin{matrix} NADH \\ \text{ou} \\ NADPH \end{matrix} + H^+$$

En général la solution utilisée pour les mesures à 340 nm comprend :

Tampon tris 0,1 M à pH 8,6	2,5 ml
Enzymes solubles	0,5 ml
Ethanol ou acétaldehyde 5 M	0,1 ml
NAD ou NADP (5 mg/ml)	0,1 ml

Certains extraits contiennent une activité $NADH_2$ oxydase, une grande partie de cette activité est inhibée en présence de KCN. Mais dans certains cas, une correction des mesures est nécessaire pour l'activité $NADH_2$ oxydase non inhibée par KCN. Pour cela, on introduit dans la solution enzymatique sans substrat 0,05 ml d'une solution à 5 mg/ml de $NADH_2$. Cette correction est rendue possible car la disparition de $NADH_2$ est linéaire au cours du temps pour l'intervalle de concentration étudié.

E/ MESURE DE LA RADIOACTIVITE

Dans quelques expériences nous avons utilisé de l'éthanol et de l'acétate marqués.

Ces deux produits fournis par le CEA ont les caractéristiques suivantes : Acétate 1-^{14}C ; activité spécifique 1,29 mCi/mM - Ethanol U-^{14}C ; activité spécifique 20 mCi/mM.

Les comptages sont généralement exprimés en d. p. m. La mesure de la radioactivité du milieu et des bactéries a été effectuée au spectromètre à scintillation liquide "Tricarb 3375" (PACKARD).

Le liquide scintillant que nous utilisons a la composition suivante :

PPO (2-5-diphenyloxazole)	50 mg
Dimétyl POPOP (1,4 bis-2 (4-methyl-5-phényloxazolyl)-benzène)	3 mg
Toluène	10 ml
Ethanol (R.P)	10 ml

Cette solution permet d'introduire 1 ml de solution aqueuse dans 20 ml de liquide scintillant. Pour une solution de ce type le rendement de comptage est de 55 pour cent.

La prise d'essai lorsque le milieu contient des bactéries est filtrée à travers une membrane millipore H.A 0,45 µ. Les bactéries recueillies sur le filtre sont ensuite lavées à l'acide trichloroacétique 5 %. Le filtre séché à l'étuve à 60°C est directement placé au fond des fioles de comptage en le recouvrant de 1,4 ml de liquide scintillant. Nous avons vérifié que dans ces conditions le rendement de comptage de la radioactivité fixée par la masse bactérienne est de 50 %.

Dans certaines expériences, nous avons piégé le $^{14}CO_2$ provenant de l'oxydation de l'acétate dans la soude 2 M.

Pour le comptage du Na_2CO_3 formé, nous avons utilisé la solution proposée par MURRAY (1971).

Le liquide scintillant que nous utilisons a la composition suivante :

Triton X 100	250 ml
Toluène	500 ml
PPO	3 g
Dimetyl POPOP	30 mg

Dans les fioles de comptage, on introduit 10 ml du liquide scintillant, 0,9 ml d'eau et 0,1 ml de la solution

de soude. Dans nos conditions de comptage, les rendements sont de 63 % et les solutions sont stables dans le temps.

F/ METHODES CHIMIQUES UTILISEES POUR LE DOSAGE DES PRODUITS DU METABOLISME

- Dosage de l'éthanol

Le dosage après distillation a été effectué par oxydation chromique. La solution de bichromate de potassium à 4,9 g/l est faite dans l'acide sulfurique à 50 %. La prise d'essai contenant l'alcool ne dépasse jamais la moitié du volume de bichromate. Le mélange est placé à la température ambiante pendant 30 mn dans un flacon à bouchon rodé de 50 ml pour une prise d'essai de 10 ml de bichromate ; puis, dilué 35 fois, le bichromate qui n'a pas oxydé l'éthanol mis en présence d'un excès d'iodure de potassium libère une quantité équivalente d'iode qui est titrée par l'hyposulfite en présence d'empois d'amidon. Les calculs sont faits à partir d'une prise témoin titrée exactement dans les mêmes conditions.

Pour les solutions d'éthanol ou d'acétaldehyde qui ont une concentration de l'ordre de 10^{-3} M nous avons effectué les dosages par la méthode manométrique de Warburg en présence de particules.

Pour l'éthanol $CH_3 - CH_2OH + O_2 \longrightarrow CH_3 - COOH + H_2O$

Pour l'acétaldehyde $CH_3 - CHO + 1/2\ O_2 \longrightarrow CH_3 - COOH$

1 µM d'éthanol entraîne une absorption de 22,4 µl d'O_2.

1 µM d'acétaldehyde entraîne une absorption de 12,2 µl d'O_2.

- Dosage de l'acide acétique

Puisque les solutions ne contiennent que l'acide

acétique comme acide volatil, les dosages se font directement après entraînement à la vapeur d'eau. On titre par la soude 0,1 M en présence de phénolphtaléine.

- *Dosage de l'acide lactique*

Ce dosage s'effectue sans aucune modification par la méthode de BARKER et SUMMERSON (1941).

- *Dosage du glucose*

Nous avons utilisé la méthode de la glucose oxydase de KEILIN et al (1948) d'après STAUB (1963).

CHAPITRE II

CINETIQUE DE LA PRODUCTION D'ACIDE ACETIQUE

Bien que le vinaigre soit connu depuis bien longtemps, son origine microbiologique fut soupçonnée lorsque KÜTZING (1837) remarqua la conversion de l'éthanol en acide acétique par des microorganismes. PASTEUR (1868) confirma cette découverte et proposa le nom de *Micoderma aceti* pour le microorganisme responsable de cette production. Il montra que la transformation de l'alcool en acide acétique sous l'influence de ce ferment s'accompagne d'une absorption considérable d'oxygène et que ceci avait lieu dans un milieu à réaction acide. La présence de l'air était considérée comme indispensable depuis longtemps déjà. Ainsi dans le procédé d'Orléans de fabrication du vinaigre on ne remplit pas les barils complètement et dans le procédé proposé par SCHÜZENBACH (1823) le générateur est rempli de copeaux de hêtre afin d'augmenter la surface d'échange, ces copeaux ont aussi l'avantage de servir de support aux bactéries.

En 1932, FRINGS proposa un générateur plus perfectionné avec insuflation d'air par le bas et dispersion au sommet du générateur du vinaigre ou du vin récupéré à la base.

Après les études de HROMATKA et al (1949, 1950, 1951 a, b, 1953) on a pu introduire dans l'industrie de la vinaigrerie la technique de culture submergée qui était déjà utilisée dans certaines industries de fermentation.

Ces études précisent les modalités d'utilisation de la culture submergée en vinaigrerie.

HROMATKA et al (1949) ont notamment remarqué, sur du vin, que la production d'acide acétique et la croissance des bactéries sont toutes deux des phénomènes exponentiels en fonction du temps.

RICHARDSON (1967) étudiant l'acétification du jus d'ananas fit la même constatation.

Ces bactéries qui sont capables de former des quantités importantes d'acide acétique atteignant parfois des concentrations de 13 %, soit 2,16 M/l (FRINGS, 1968), meurent rapidement lorsque l'aération cesse si le milieu où elles se trouvent est acide.

Il nous a semblé intéressant de préciser dans cette première étude la cinétique de la production d'acide acétique car on ne dispose pas dans la littérature d'une connaissance suffisamment précise des processus de la production et du comportement des bactéries au cours de cette transformation.

A/ *PRODUCTION REALISEE PAR A. XYLINUM (DIVIES, 1970 a.)*

Nous avons réalisé cette première étude avec une souche d'*A. xylinum* isolée dans le "fermenteur" d'une vinaigrerie et identifiée selon la classification proposée par FRATEUR (1950).

1° - Conditions de culture

a) Source de carbone

La souche étudiée ne se développe pas dans le milieu minéral avec l'éthanol comme unique substrat carboné, il faut alors lui ajouter du glucose ou du lactate,

le succinate ne convient pas. Sur milieu minéral cette croissance est lente, les taux de croissance ou nombre de divisions par heure sont de 0,012 et 0,010 sur glucose et lactate respectivement.

L'addition au milieu minéral de 0,5 g/l d'extrait de levures améliore nettement la croissance ; on obtient un taux de croissance de 0,13 pour le glucose et de 0,09 pour le lactate. Nous avons reproduit sur la figure 2 (courbes 1 et 2), la production d'acide acétique réalisée en présence de glucose et de lactate.

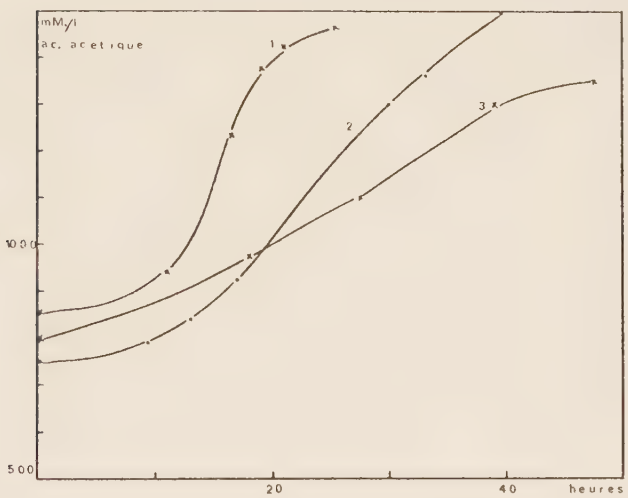

Fig. 2 : Production d'acide acétique réalisée avec A. xylinum en présence de différents substrats carbonés et à différentes aérations.

Courbe 1. Substrat carboné : glucose, Aération : 100 mM O_2/l. heure

Courbe 2. Substrat carboné : lactate, Aération : 100 mM O_2/l. heure

Courbe 3. Substrat carboné : lactate, Aération : 40 mM O_2/l. heure

Milieu minéral avec 0,5 g/l d'extrait de levures.

b) *Aération*

L'expérience nous a montré (figure n° 2, courbes 2 et 3) qu'il fallait que la quantité d'oxygène transférée au liquide, telle qu'elle est mesurée par la méthode de SCHULTZ et GADEN (1956), soit largement supérieure à la quantité strictement nécessaire pour transformer l'éthanol en acide acétique. Ainsi, figure 2, courbe 2, la demande d'O_2 nécessaire pour la transformation est de 32 mM O_2/l et par heure, nous constatons (courbe 3) qu'un apport de 40 mM O_2/l et par heure n'est pas suffisant et que dans ces conditions, la consommation d'O_2 observée est de 19 mM O_2/l et par heure.

c) *Ensemencement des cultures*

Les cultures sont initialement ensemencées avec des bactéries qui se sont développées en cultures agitées sur le même milieu. Pour les cultures successives on effectue les rechargements alors qu'il ne reste plus dans le milieu que 50 mM/L d'éthanol, dans ce cas on observe une phase de latence de 7 à 10 h. Les courbes présentées, figure 2 correspondant à ce cas, le rechargement a consisté pour un volume total de 1,3 l à enlever 600 ml de milieu transformé et à rajouter 600 ml de milieu non transformé à la même température de 30°C.

Si l'on attend que l'éthanol ait complètement disparu, la culture suivante met quelques jours avant de se développer. Ce phénomène est bien connu dans l'industrie où l'on utilise des systèmes dosant l'éthanol automatiquement de façon à ce que le départ d'une nouvelle culture puisse être réalisé dès la fin de la transformation précédente.

2° - Etude de la croissance et de la production d'acide acétique

a) Culture discontinue

Au cours de la culture, nous avons suivi la production d'acide acétique en fonction de la croissance. Soient P, la concentration du milieu en acide acétique et N, la concentration en bactéries, $\frac{dN}{dt} \times \frac{1}{N}$ représente la vitesse spécifique de croissance ou encore le taux de croissance népérien, $\frac{dP}{dt} \times \frac{1}{N}$ représente la vitesse spécifique de production d'acide.

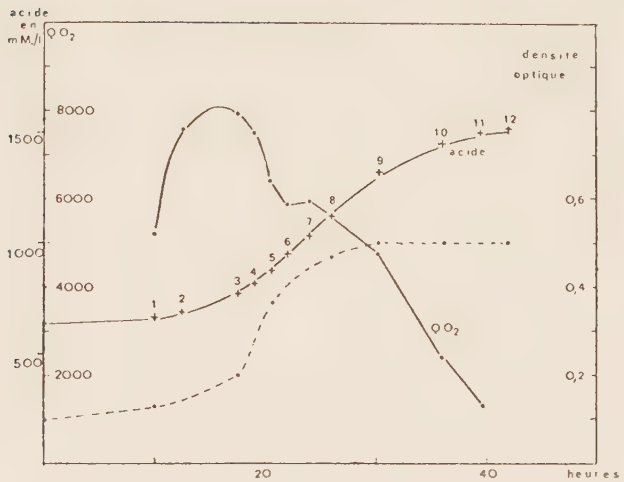

Fig. 3 : *Croissance d'A. xylinum et production d'acide acétique.*

+——— + *Acide acétique* ; .----. *densité optique due aux bactéries* ; .———. $Q\ O_2$ = *µl* O_2/*heure. mg de poids sec.*

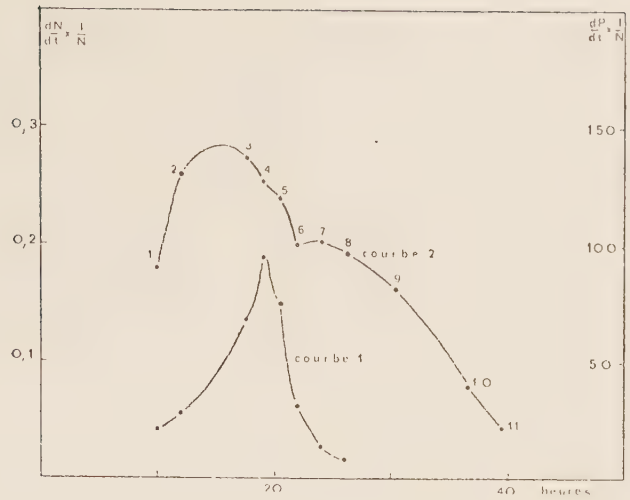

Fig. 4 : Vitesses spécifiques de croissance et de production d'acide en fonction du temps.

Courbe 1. $\frac{dN}{dt} \times \frac{1}{N}$ *vitesse spécifique de croissance.*

Courbe 2. $\frac{dP}{dt} \times \frac{1}{N}$ *vitesse spécifique de production d'acide.*

Ces courbes sont construites à l'aide de la fig. n° 3 points numérotés de 1 à 11.

A partir de l'expérience faisant l'objet de la figure n° 3, nous avons reproduit, figure n° 4, les valeurs $\frac{dP}{dt} \times \frac{1}{N}$ et $\frac{dN}{dt} \times \frac{1}{N}$ calculées par la méthode graphique.

$\frac{dP}{dt} \times \frac{1}{N}$ est exprimé en µmoles d'acide formé dans 1 ml de milieu par heure et par unité de densité optique. $\frac{dN}{dt} \times \frac{1}{N}$ représente la variation de densité optique par heure et par unité de densité optique.

Remarquons que $\frac{dP}{dt} \times \frac{1}{N} \times K = QO_2$ représente l'absorption d'oxygène qui sert à la transformation de

l'éthanol par les bactéries, on suppose pour cela que l'éthanol est entièrement transformé en acétate en utilisant une molécule d'oxygène. Cette valeur de QO_2 est exprimée en µl d'O_2 absorbé par heure et par mg du poids sec des bactéries. Nous avons porté sa valeur, figure n° 3. K représente la constante de conversion de la vitesse spécifique de la production d'acide en vitesse spécifique d'absorption d'oxygène.

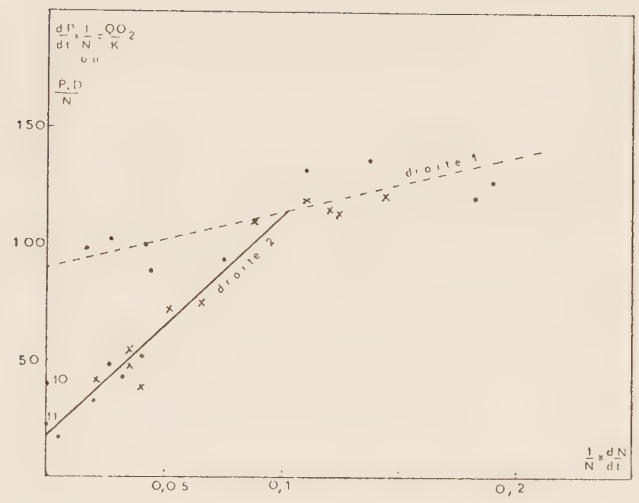

Fig. 5 : Relation entre la vitesse spécifique de la croissance et la vitesse spécifique de la formation de produit.

droite 1. équation $\frac{dP}{dt} \times \frac{1}{N} = 210\,\mu + 90$,

construite à partir des données de la figure n° 3, les points 10 et 11 correspondent aux points 10 et 11 de la figure n° 3.

droite 2. équation $\frac{dP}{dt} \times \frac{1}{N} = 940\,\mu + 18$,

construite, à partir d'une croissance qui se déroule avec 900 mM/l d'acide acétique en début de croissance.

° points obtenus en culture discontinue.

x points obtenus en culture continue.

Nous avons vu dans le texte que

$$\frac{dP}{dt} \times \frac{1}{N} = \frac{QO}{K}2 \text{ et que } \frac{PD}{N} = \frac{QO}{K}2.$$

La figure n° 5 représente la relation liant la vitesse spécifique de production d'acide à la vitesse spécifique de croissance. Cette relation linéaire est bien vérifiée jusqu'à la 35e heure de culture (droite 1) mais 5 heures après la fin de la croissance, elle n'est plus vérifiée (points 10 et 11). L'expérience nous a montré que lorsque la croissance se déroule avec une teneur en acide acétique plus importante en début de culture de l'ordre de 900 mM/l (figure 5, droite 2), la relation observée n'est pas la même.

Dans les deux cas $\frac{dP}{dt} \times \frac{1}{N} = \frac{a}{N} \times \frac{dN}{dt} + b = a\mu + b$. Pour la droite 1, nous avons : $\frac{dP}{dt} \times \frac{1}{N} = 210\ \mu + 90$, pour la droite 2 : $\frac{dP}{dt} \times \frac{1}{N} = 940\ \mu + 18$.

Nous reviendrons dans la conclusion sur l'interprétation des constantes a et b.

b) *Culture continue*.

Nous appelons F le débit d'écoulement, V le volume du réacteur et nous posons $\frac{F}{V} = D = \frac{1}{\Theta}$; D étant le taux de dilution et Θ le temps de demi renouvellement du milieu dans le réacteur exprimé dans toutes nos expériences en heures (h).

Au cours de la culture continue, l'augmentation du nombre des cellules dans le réacteur $(\frac{dN}{dt})R$ est égale à l'augmentation totale des cellules moins la perte due à l'écoulement soit :

$$(\frac{dN}{dt})_R = \mu N - \frac{N}{\Theta}$$

Nous avons vu que la vitesse de la production d'acide $\frac{dP}{dt}$ est égale à

$$\frac{dP}{dt} = a \frac{dN}{dt} + bN$$

ou $\frac{dP}{dt} = \frac{dN}{dt} \left(a + \frac{bN}{dN} \times dt \right)$ posant $a + \frac{b}{\mu} = \alpha$,

il vient $$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dN}{dt}$$

L'augmentation de la production d'acide dans le réacteur ($(\frac{dP}{dt})_R$) sera égale à :

$$(\frac{dP}{dt})_R = \alpha \frac{dN}{dt} - \frac{P}{\theta} = \alpha \mu N - \frac{P}{\theta}$$

A l'état d'équilibre :

$$(\frac{dN}{dt})_R \text{ et } (\frac{dP}{dt})_R = 0 \quad \text{d'où} \quad \mu = \frac{1}{\theta} = D$$

$$\text{et} \quad P = \alpha N$$

ou encore :

$$\frac{PD}{N} = a D + b$$

Nous avons porté sur la figure n° 5, les résultats expérimentaux obtenus en culture continue (avec une concentration initiale d'éthanol de 10 %). Nous constatons qu'ils répondent aux deux équations obtenues en culture discontinue selon la teneur en acide acétique du milieu de croissance.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Pour la souche étudiée, le glucose est la meilleure source de carbone que nous ayons testée et que l'on peut utiliser pour réaliser la production d'acide acétique. Cette constatation avait été faite par BAETSLE (1950). Lorsque le milieu est suffisamment riche en acides aminés, on n'observe pas d'activation pour la croissance entre le glucose, l'acide lactique et l'acide succinique ; néanmoins, pour des solutions nutritives dans lesquelles on a remplacé l'extrait de levures par des levures pressées, on constate que l'addition de lactate ou de succinate améliore la croissance (résultats non publiés). Ainsi, la production d'acide η exprimée en grammes d'acide acétique formés par 100 ml de milieu et par 24 heures, passe de 4 à 7,65 par addition de 10^{-3}M de lactate ou de succinate.

Nous pensons que ces substrats favorisent le fonctionnement du cycle tricarboxylique ; en effet, il a souvent été constaté que ces mêmes substances favorisent l'oxydation de l'acétate (DUPUY, 1957). Récemment, BENZIMAN (1969,a) a suggéré que la phosphoenolpyruvate carboxylase pourrait jouer le rôle de maintien et de fournisseur d'acide dicarboxylique ; nous pensons que ces substances serviraient au fonctionnement de cette enzyme en augmentant la concentration en CO_2 du milieu.

En fin de transformation, nous avons observé que lorsque la quantité de glucose ou de lactate était supérieure ou égale à 100 mg/l; il n'y avait pas de ralentissement et que la culture suivante ne présentait pas de phase de latence importante. HROMATKA et al (1951, a, b) ont remarqué qu'une interruption de quelques secondes dans l'aération suffisait à entraîner l'arrêt de la production. On peut donc penser que le manque d'oxygène ou le manque d'énergie entraîne la suppression de la faculté de se multiplier pour les bactéries acétiques, cette action s'accompagnant de la dénaturation de l'alcool deshydrogénase particulaire pour de fortes concentrations d'éthanol ou d'acide acétique (DIVIES, 1967).

L'étude de la cinétique nous montre que la croissance des bactéries et la production d'acide sont liées par une relation du type $\frac{dP}{dt} = a \frac{dN}{dt} + b\ N$ ou encore $\frac{dP}{dt} \times \frac{1}{N} = a\ \mu + b$ relation analogue à celle de la production d'acide lactique à partir du glucose par les bactéries lactiques (LUEDEKING et PIRET, 1959).

La relation déterminée en culture discontinue se trouve vérifiée en culture continue, dans ce cas $\frac{PD}{N} = a\ D + b$.

Théoriquement la production d'acide et la croissance des cellules sont proportionnelles au nombre des cellules : $\frac{dP}{dt} = K\ N$ et $\frac{dN}{dt} = \mu\ N$, donc $\frac{dP}{dt} = \frac{K}{\mu}\ \frac{dN}{dt}$.
La relation expérimentale que nous avons observée est de la forme $\frac{dP}{dt} = a\ \frac{dN}{dt} + b\ N$. Dans nos conditions expérimentales on peut considérer que la consommation d'éthanol par les cellules correspond à l'acide acétique accumulé dans le milieu. En supposant que la consommation d'éthanol par les cellules sert à la fois d'énergie de maintien aux microorganismes et à la synthèse de matière cellulaire, on peut écrire que :

$$\frac{dP}{dt} = \left(\frac{dP}{dt}\right)_M + \left(\frac{dP}{dt}\right)_G$$

La fraction de substrat utilisée comme énergie de maintien des cellules est égale à :

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_M = m\ N$$

expression dans laquelle m représentera les μ moles d'acide produit ou d'éthanol consommé par heure et par unité de densité optique.

La fraction de substrat utilisée comme énergie servant à la synthèse de la matière cellulaire sera égale à:

$\left(\frac{dP}{dt}\right)_G = \frac{\mu N}{YG}$, Y_G représentant le véritable rendement de croissance.

Tenant compte de ces expressions on a :

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu N}{YG} + m\ N = \left(\frac{\mu}{YG} + m\right) N$$

Sachant d'autre part que $\frac{dN}{dt} = \mu\ N$ et que $\mu = \frac{dN}{dt} \times \frac{1}{N}$ il vient $\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_G}\ \frac{dN}{dt} + m\ N$

Dans notre expérience $a = \frac{1}{Y_G}$ et est exprimé en μ moles d'acide formées par unité de densité optique,

b = m et est exprimé en µ moles d'acide formées par unité de densité optique et par heure. Nous reviendrons au paragraphe suivant sur la valeur des coefficients Y_G et m.

Pour l'instant remarquons (figure n° 5) que dans les conditions de la droite 1 lorsque la teneur du milieu en acide est inférieure à 900 m M/l le rendement réel de croissance Y_G en ce qui concerne l'éthanol est supérieur au rendement de croissance obtenu avec une quantité d'acide acétique inférieure à 900 m M/l, et la même constatation peut être faite pour le coefficient b représentant l'énergie de maintien des cellules. Comme nous l'avons vu $\frac{dP}{dt} \times \frac{1}{N} = \frac{QO}{K}2$ et $\frac{P.D.}{N} = \frac{QO}{K}2$, K représente le coefficient de conversion entre la vitesse spécifique de production d'acide et la vitesse spécifique d'absorption d'oxygène.

Nous observons (figure n° 5) que le QO_2 optimal est obtenu pour les cellules qui effectuent leur croissance dans les conditions de la droite 1, c'est-à-dire lorsque la teneur en acide acétique du milieu est inférieure à 900 mM/litre.

Le maximum d'oxydation des cellules est obtenu au cours de leur croissance active, ainsi (figures n° 3 et 4) le QO_2 maximal est de 7 950 µl O_2/mg de poids sec et par heure. Dans le cycle de transformation d'une durée de 40 heures (figure n° 3) on observe un QO_2 supérieur à 5 200 pendant une durée de 12 heures, c'est-à-dire lors de la croissance accélérée des cellules. Ce résultat est vérifié en culture continue.

Pour la conduite de la fermentation en culture discontinue, dans des conditions optimales, il faut donc s'attacher à obtenir la meilleure croissance des cellules.

B/ ETUDE DE LA PRODUCTION D'ACIDE ACETIQUE PAR A. *mesoxydans* CULTIVE EN CULTURE CONTINUE

L'étude de la cinétique de la production d'acide acétique nous montre que le maximum d'oxydation des cellules est obtenu au cours de leur croissance active puisque l'on observe une relation du type $\frac{dP}{dt} \times \frac{1}{N} = a\,\mu + b$.

En culture continue cette relation devient $P \times D = (a\,D + b)\,N$. Le produit $P \times D$ représente la productivité du réacteur considéré c'est-à-dire la quantité d'acide acétique produite par litre et par heure. Pour optimaliser la productivité il suffit que le produit $(a\,D + b)\,N$ soit maximal. C'est pourquoi, nous avons recherché les conditions d'optimalisation de ce produit. La souche d'*Acetobacter xylinum* a été remplacée pour cette étude par *Acetobacter mesoxydans* qui forme une suspension cellulaire homogène dans nos colonnes de transformation. Dans les endroits de moindre turbulence, A. *xylinum* forme des agrégats au bout de quelques jours.

A. *mesoxydans* utilisé présente en outre l'avantage de former une colonie caractéristique d'aspect granuleux sur le milieu gélosé G_2.

1° - Etude nutritionnelle

Pour effectuer cette étude, nous avons fait une préculture d' A. *mesoxydans* sur le milieu de culture avec extrait de levures à 0,5 g/l dont la composition est fournie dans le chapitre I. Au bout de 24 heures, après centrifugation et lavage des cellules à l'eau physiologique stérile, les fioles de 100 ml de composition différente sont ensemencées. Au cours de la culture les pH sont maintenus entre 3 et 5 par adjonction de soude ou d'acide sulfurique.

TABLEAU N° I

Croissance d'A. mesoxydans en fonction de la source de carbone et de la source d'azote.

Source de carbone	Source d'azote	Croissance au bout de 190 h en d.o. à 575 nm
Glucose	NH_4^+	0,02
	NH_4^+ + Y.E.	0,1
Ethanol	NH_4^+	0,02
	NH_4^+ + Y.E.	0,1
Lactate	NH_4^+	0,07
	NH_4^+ + Y.E.	0,75
Citrate	NH_4^+	0,01
	NH_4^+ + Y.E.	0,02
Glucose + Ethanol	NH_4^+	1,29
	NH_4^+ + Y.E.	2,08
Glucose + Lactate	NH_4^+	1,5
	NH_4^+ + Y.E.	1,5
Glucose + Acétate	NH_4^+	0,64
	NH_4^+ + Y.E.	0,75
Glucose + Alanine	NH_4^+	0,06
	NH_4^+ + Y.E.	0,15
Ethanol + Lactate	NH_4^+	0,99
	NH_4^+ + Y.E.	0,98
Ethanol + Acétate	NH_4^+	0,01
	NH_4^+ + Y.E.	0,14

Les concentrations utilisées sont de : citrate : 100 mM/l ; lactate : 69 mM/l ; glucose : 10 mM/l ; acétate : 75 mM/l ; éthanol : 150 mM/l ; alanine (DL) : 45 mM/l ; $(NH_4)_2SO_4$: $7,6.10^{-3}$ M/l ; extrait de levures (Y.E.) 0,5 g/l.

Nous constatons (tableau I) qu'il faut pour qu'il y ait croissance, présence de sels d'ammonium, et deux sources de carbone telles que le glucose et l'éthanol.

Nous constatons la croissance des cellules sur le milieu minéral en présence de glucose et d'éthanol comme source de carbone, ce milieu ne convient pas pour réaliser la production d'acide acétique avec des concentrations d'éthanol couramment utilisées dans l'industrie. C'est pourquoi dans l'étude qui suit, nous avons utilisé le milieu glucose - éthanol avec 0,5 g/l d'extrait de levures.

2° - *Culture continue d'A. mesoxydans*

Nous savons que pour réaliser une culture en continu, il faut que le coefficient de dilution D soit inférieur ou égal au taux de croissance népérien maximum du microorganisme ; si cette condition est réalisée, il s'établit un équilibre.

La production d'acide acétique est une transformation dans laquelle un des substrats c'est-à-dire l'éthanol, et le produit de ce substrat, l'acide acétique, sont inhibiteurs de la croissance des bactéries aux concentrations où ils sont utilisés. Nous verrons qu'il faut tenir compte de ces remarques pour expliquer les résultats obtenus. D'autre part, nous avons déjà montré avec une autre souche de bactéries acétiques (DIVIES et DUPUY, 1969) qu'au cours de la croissance sur éthanol, on observe deux phases dans la croissance : une première phase, oxydation de l'éthanol et accumulation d'acide acétique et une seconde phase d'oxydation de l'acide acétique accumulé.

La souche que nous utilisons pour cette étude demande pour son développement dans les conditions de la production d'acide acétique deux substrats carbonés : l'éthanol et le glucose. Mais si l'on considère l'éthanol, le

glucose étant fourni en excès, on retrouve les deux phases observées dans la croissance comme pour *Acetobacter rancens*.

Dans l'analyse des différents états d'équilibre obtenus en fonction du taux de dilution, on doit donc tenir compte de ce phénomène.

a) *Cas où l'éthanol représente le facteur nutritif limitant*

Lorsque l'éthanol constitue l'élément nutritif limitant, on doit observer un état d'équilibre pour lequel l'éthanol est consommé au fur et à mesure qu'il est introduit dans le réacteur.

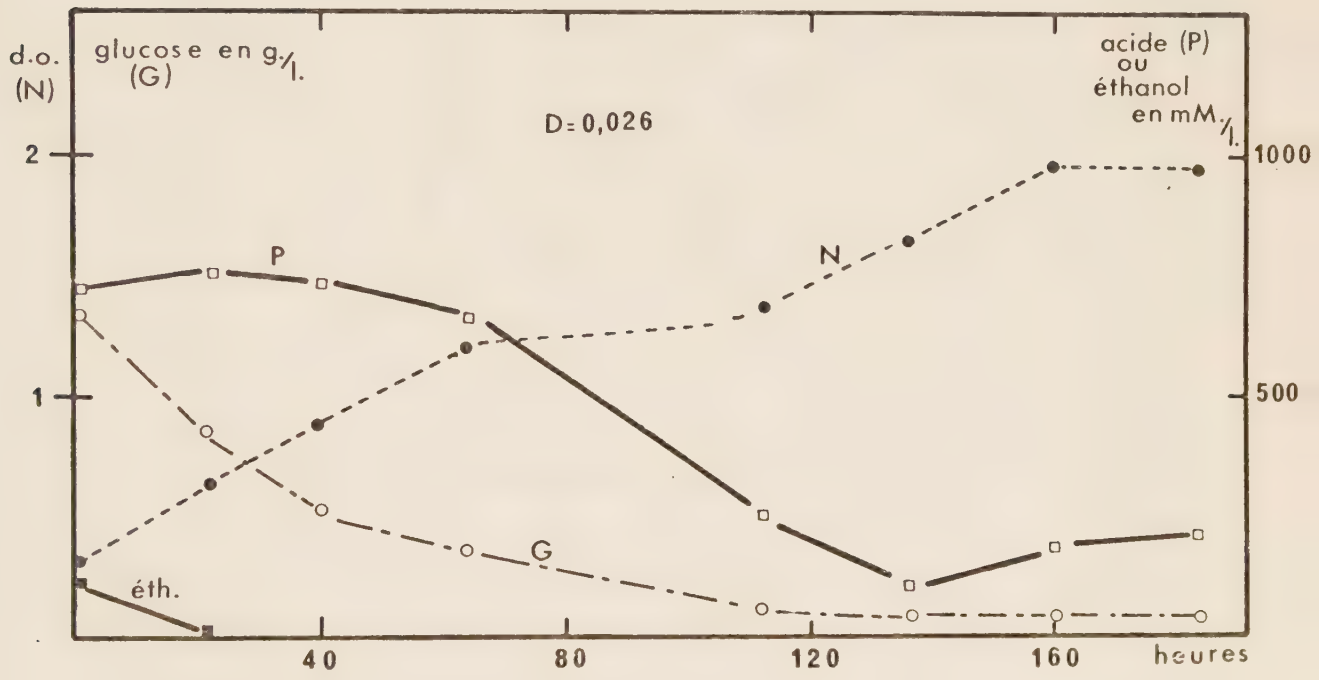

Fig. 6 : Evolution de la population bactérienne, de l'acidité de la teneur en éthanol et en glucose, lorsque l'éthanol constitue le substrat limitant.

Le taux de dilution D = 0,026, la teneur en éthanol du liquide d'alimentation est de 0,96 M.

●--● densité optique du milieu,
▫-▫ Acide acétique, ■ — ■ éthanol, ○ — ○ glucose.

Ainsi, figure n° 6, pour un taux de dilution D = 0,026, avec une solution nutritive ayant une teneur en éthanol de 0,960 M/l, on constate qu'il n'y a pas une quantité correspondante d'acide acétique accumulé. L'acide acétique produit est à son tour oxydé lorsque l'éthanol a disparu du milieu de culture.

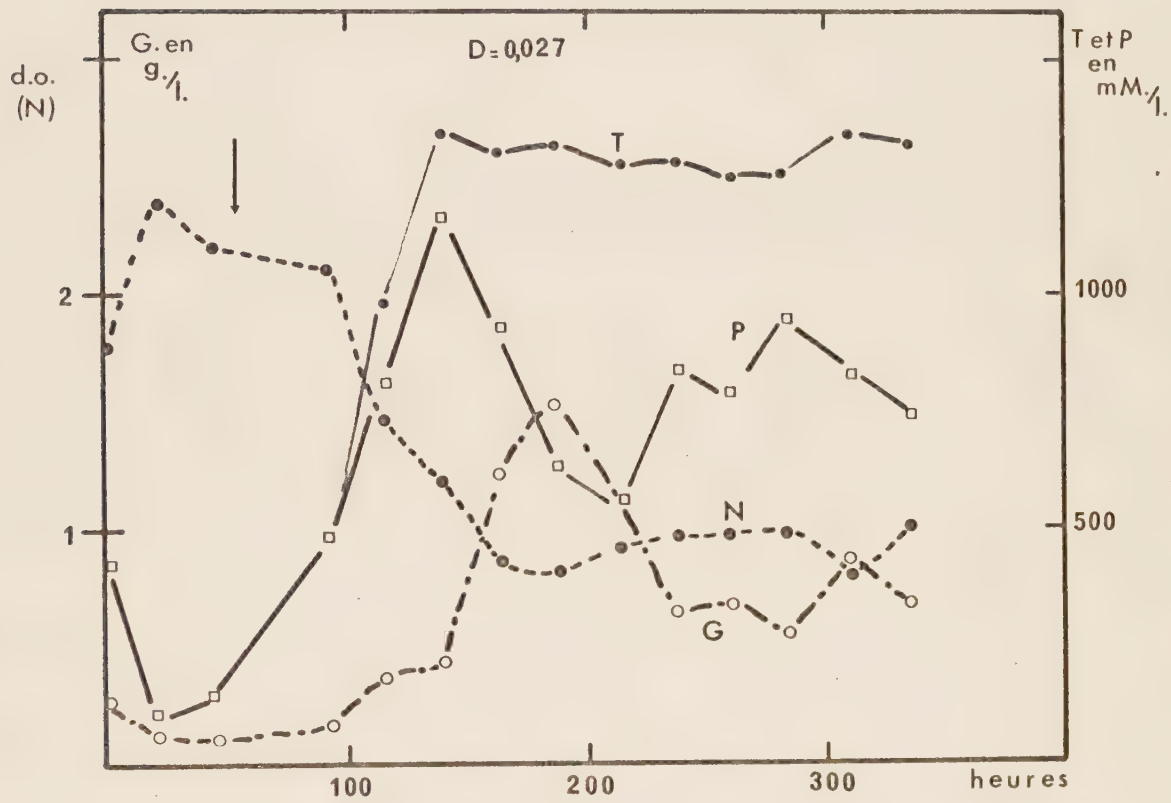

Fig. 7 : Evolution de la population bactérienne (N), de l'acidité (P), et du total T (éthanol + acide acétique) lorsque l'éthanol ne constitue plus le facteur limitant.

Taux de dilution D = 0,027. Initialement, la teneur en éthanol du liquide d'alimentation est de 0,96 M, on porte brusquement sa concentration à 1,6 M, le moment est indiqué par une flèche.

densité optique du milieu, acide acétique, Total de la somme éthanol + acide acétique, glucose restant dans le milieu en grammes par litre.

Dans une autre expérience représentée figure n° 7, lorsque l'éthanol est à nouveau fourni en excès, on constate que les cellules accumulent à nouveau l'acétate. 82 heures après le changement de concentration en éthanol du milieu d'alimentation l'équilibre est atteint. Cette valeur de 82 heures correspond au temps calculé d'après l'équation $\log \frac{T}{Ti} = \frac{Dt}{2,3}$, équation dans laquelle T représente la concentration du total éthanol plus acétate, D le coefficient de dilution.

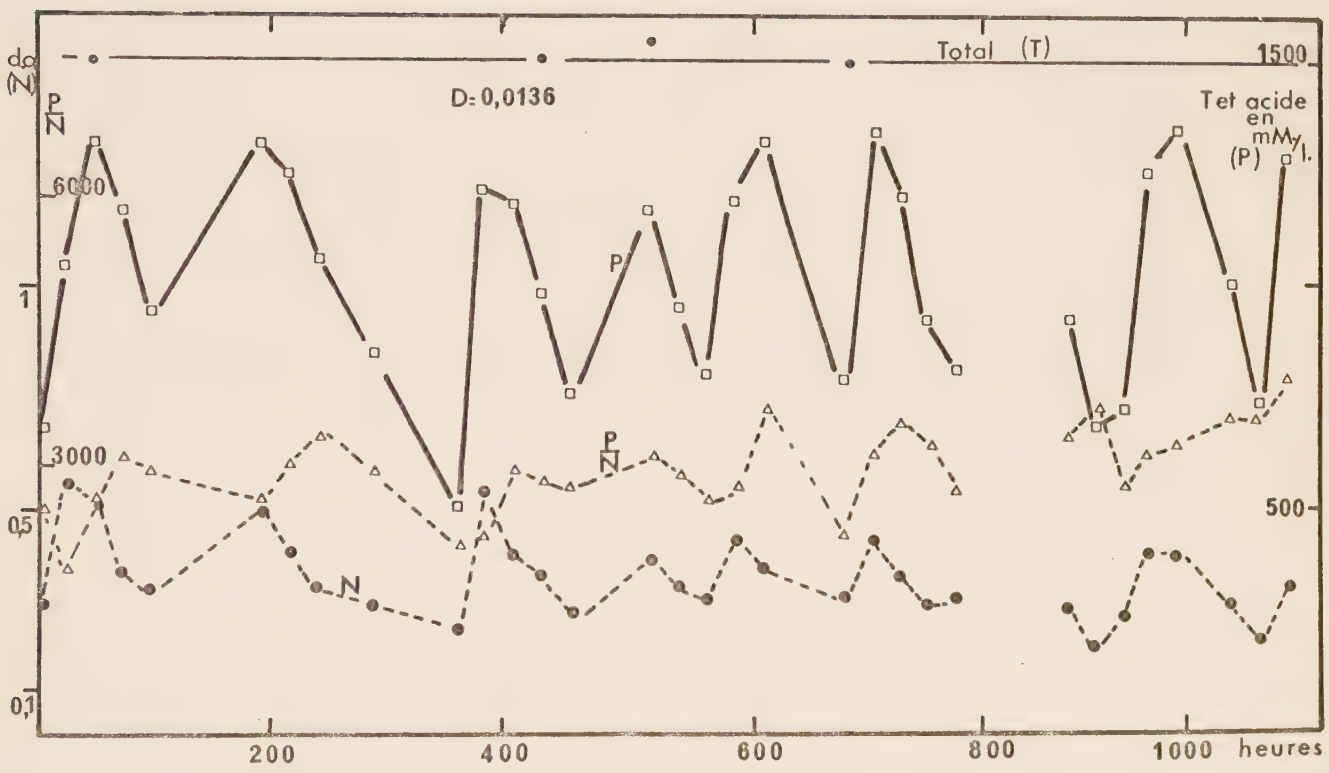

Fig. 8 : Etat d'équilibre observé pour un taux de dilution D = 0,0136.

●---● densité optique du milieu, ▫—▫ acide acétique en m M/ℓ, ●—● Total (éthanol + acide acétique) en m M/ℓ, Δ---Δ rapport acide acétique sur densité optique ($\frac{P}{N}$).

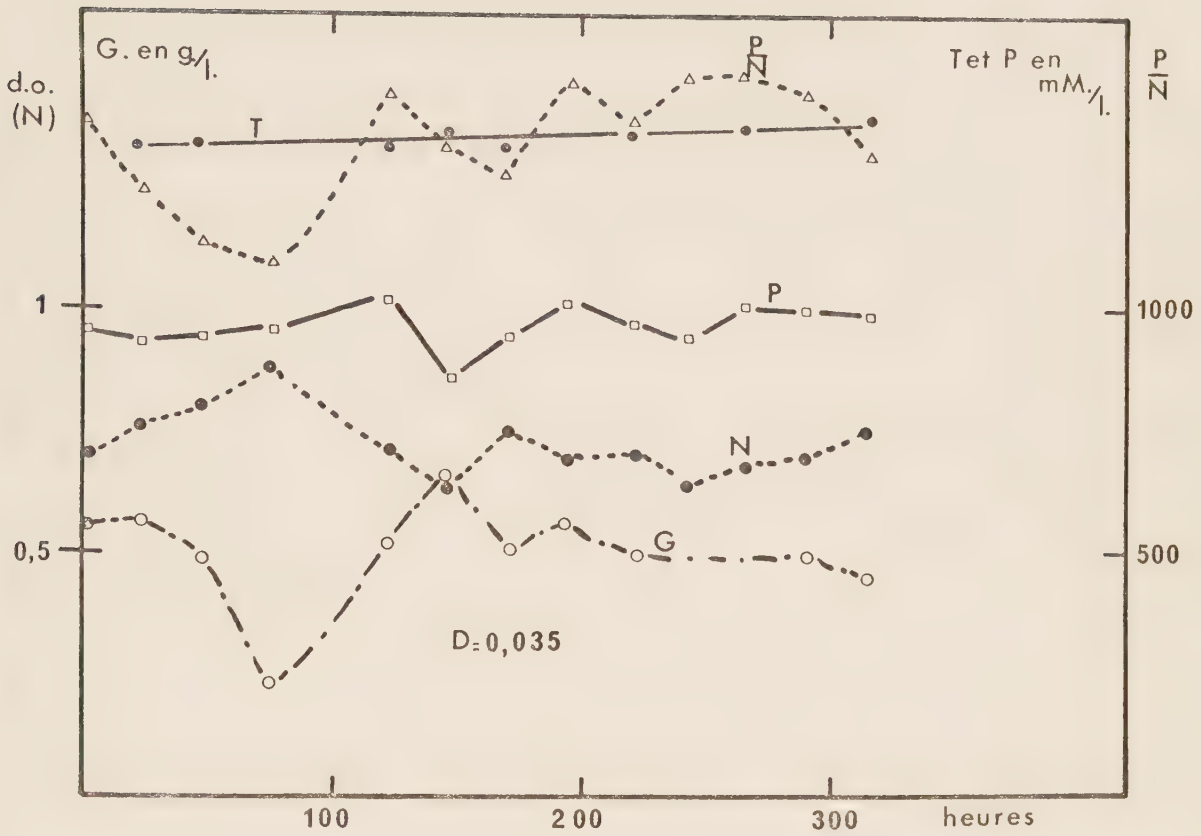

Fig. 9 : *Etat d'équilibre observé pour un taux de dilution D = 0,035.*

o---o *glucose restant dans le milieu en g/l. Les autres symboles sont identiques à ceux de la figure 8.*

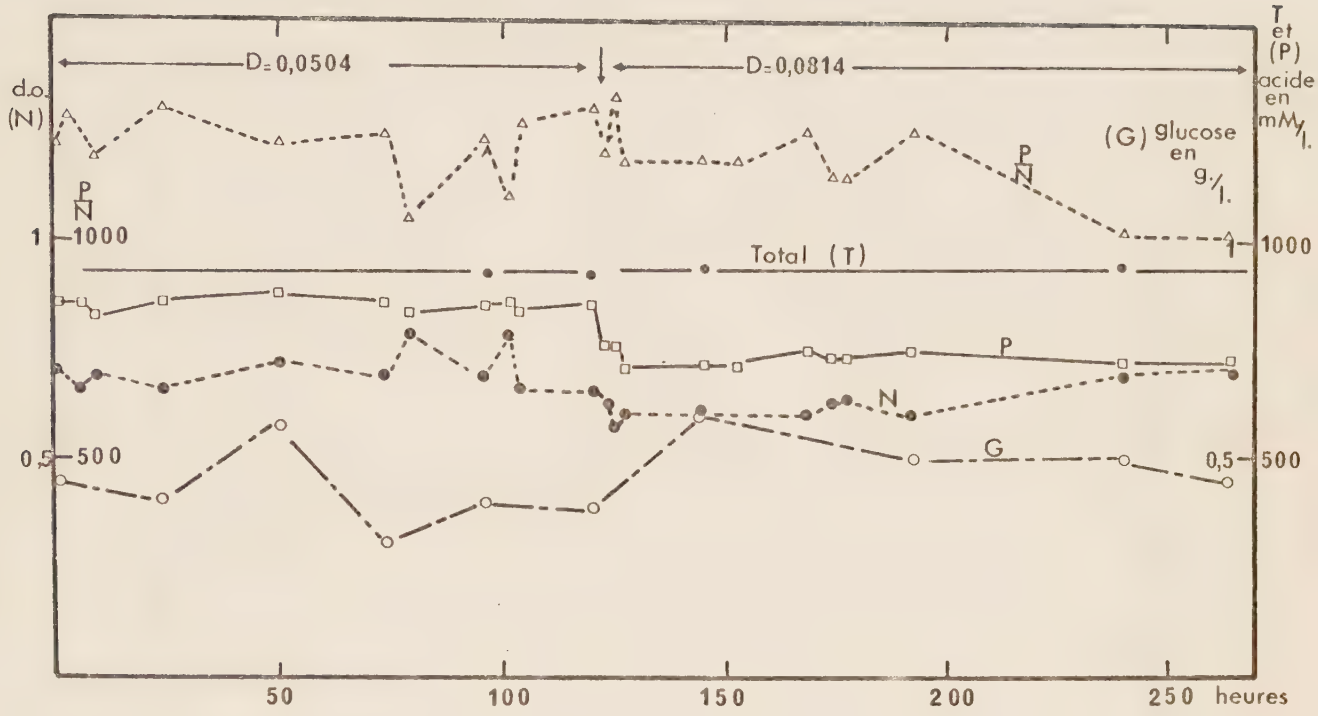

Fig. 10 : *Etat d'équilibre observé pour D = 0,0504 et D = 0,0814.*

Les symboles utilisés pour la représentation des courbes sont identiques à ceux utilisés figure 8 et figure 9.

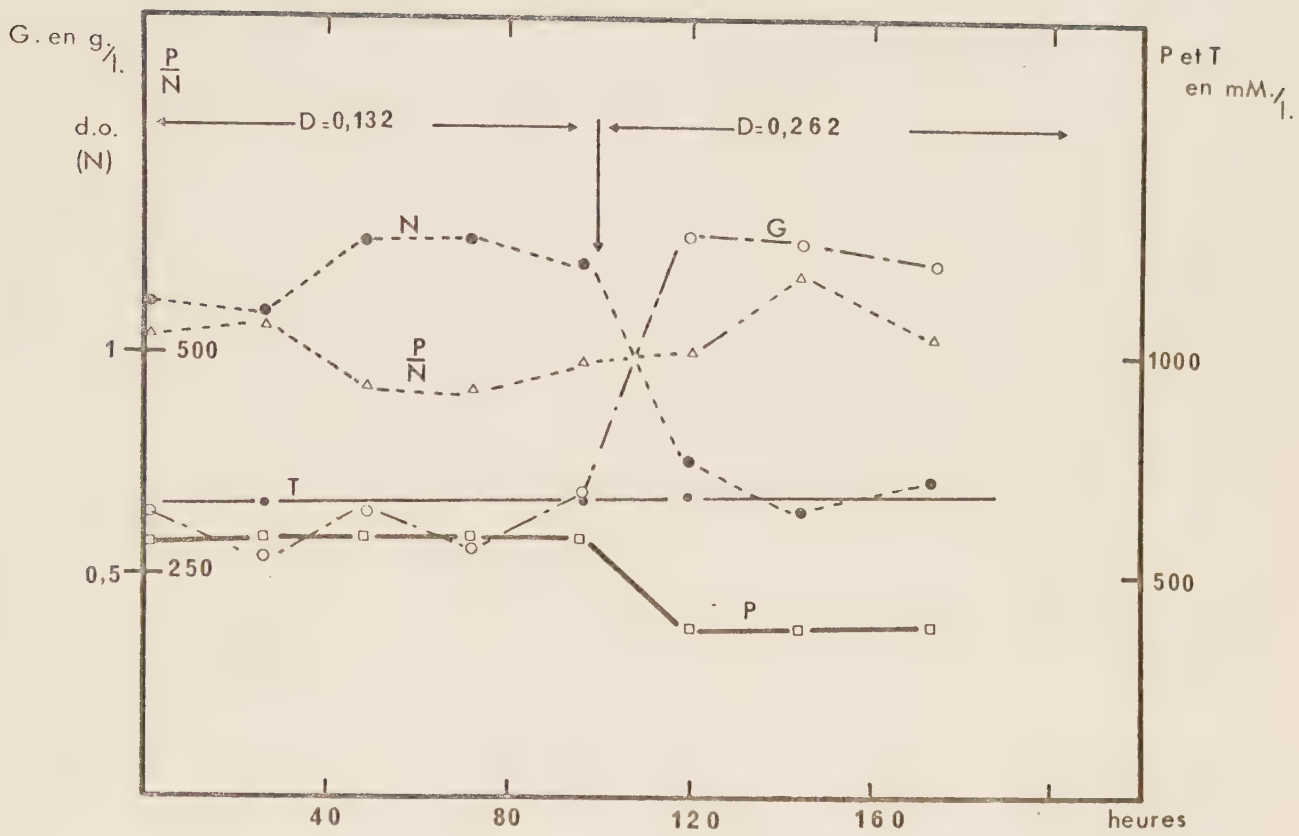

Fig. 11 : *Etat d'équilibre observé pour D = 0,132 et D = 0,262.*

Les symboles utilisés pour la représentation des courbes sont identiques à ceux utilisés figures 8 et 9.

b) *Cas où l'éthanol n'est pas le facteur nutritif limitant*

Il n'est pas intéressant du point de vue industriel de se placer dans les conditions où l'éthanol constitue le facteur nutritif limitant pour optimaliser la production d'acide acétique. Dans ces conditions on observe une faible vitesse de transformation de l'éthanol et de plus il peut se produire l'oxydation de l'acétate. Nous rapportons donc dans cette partie les résultats obtenus dans le cas où l'éthanol n'est pas limitant.

Lorsque l'éthanol est fourni en excès, nous avons constaté pour un taux de dilution donné qu'en augmentant la teneur en glucose ou en extrait de levures du liquide d'alimentation, il n'y a pas augmentation de la quantité d'acétate accumulé si bien que dans nos conditions de culture, le premier facteur limitant lorsque l'éthanol est fourni en excès, est représenté par l'acétate.

Nous représentons (figures n° 8, 9, 10 et 11) les différents types "d'états d'équilibres" que nous avons pu observer.

- Au faible taux de dilution D = 0,0136 (figure n° 8) on constate une grande variation dans la teneur en acide et dans la population. Nous reviendrons dans la discussion sur les différentes hypothèses pour expliquer ce phénomène.

- Au taux de dilution D = 0,035 (figure n° 9) le phénomène est moins accentué. Les fluctuations autour du point moyen de l'acidité sont de l'ordre de 5 à 10 % alors que nous constatons que les fluctuations observées dans la population (la population est évaluée par turbidimétrie après dilution dans la zone de proportionalité entre la densité optique et le poids sec) est de 11 à 25 %.

- Pour les taux de dilution plus importants (figures 10 et 11) l'acidité présente une valeur sensiblement constante, alors que les fluctuations observées dans la population sont encore assez importantes.

c) *Analyses des états d'équilibre obtenus lorsque l'éthanol n'est pas le facteur nutritif limitant*

Nous avons vu que pour les taux de dilution supérieurs à 0,02 et inférieurs à 0,04, les variations observées à l'état d'équilibre dans nos conditions expérimentales sont de l'ordre de 5 à 10 % pour l'acidité et de 11 à 25 % pour la population. Pour les taux de croissance supérieurs, les fluctuations de l'acidité à l'état d'équilibre sont beaucoup moins importantes alors que les fluctuations observées dans la population sont encore assez importantes (figures 10 et 11). Nous avons retenu pour notre analyse les résultats obtenus lorsque le taux de dilution D = 0,02.

Afin d'exploiter nos résultats, nous avons choisi de mesurer un "état d'équilibre" sur une période de 100 heures et de le caractériser par la moyenne des déterminations effectuées.

Nous avons porté dans le tableau II le résultat de ces déterminations. Nous avons classé les résultats en quatre catégories selon le total de la teneur du milieu en éthanol et en acide acétique : total de 1350 à 1215 mM/l ; 1070 à 910 mM/l ; 880 à 819 mM/l et 690 à 640 mM/l.

Nous avons représenté (figure n° 12 a) la valeur à l'état d'équilibre de l'acidité (P) en fonction du taux de dilution D.

D Taux de dilution	Teneur en éthanol m M/l	Teneur en acide acétique m M/l (P)	Total éthanol + ac. acétique en m M/l (T)	Glucose consommé en m M/l	Population en g/l (poids sec)
0,0235	432	818	1350		0,22
0,0265	274	956	1230	8,72	0,199
0,035	389	961	1350	8,27	0,223
0,0395	386	870	1256		0,251
0,0515	545	755	1300		0,210
0,0735	620	630	1250	8,08	0,198
0,082	650	565	1215	7,88	0,182
0,0238	40	975	1015	9,41	0,195
0,0504	70	850	920	8,76	0,232
0,0557	72	838	910	8,91	0,204
0,0618	175	775	950	8,01	0,192
0,0649	182	758	940	8,16	0,204
0,069	342	745	1087	8,23	0,198
0,0814	225	725	950	8,26	0,192
0,092	282	688	970	8,038	0,251
0,0954	426	644	1070	7,87	0,243
0,0994	298	664	962	7,67	0,234
0,105	324	606	930	7,61	0,228
0,1365	495	505	1000	6,13	0,22
0,1058	203	677	880	7,85	0,248
0,153	302	517	819	7,11	0,261
0,1661	350	507	850	6,96	0,279
0,1925	415	435	850	6,05	0,286
0,23	492	358	850	5	0,223
0,132	80	580	660	7,7	0,365
0,16	143	547	690	5,77	0,297
0,1959	131	529	660	6,94	0,331
0,227	161	479	640	5,82	0,294
0,24	183	457	640	6,27	0,287
0,262	290	380	670	4,24	0,217

Tableau II. *Valeurs moyennes des déterminations effectuées pour les différents états d'équilibre lorsque l'éthanol ne constitue pas l'élément nutritif limitant.*

Les résultats sont classés en quatre catégories, selon la teneur totale T du milieu en éthanol et en acide acétique : $1350 \leq T \leq 1215$, $1070 \leq T \leq 910$, $880 \leq T \leq 819$, $690 \leq T \leq 640$. T est exprimé en m M/l.

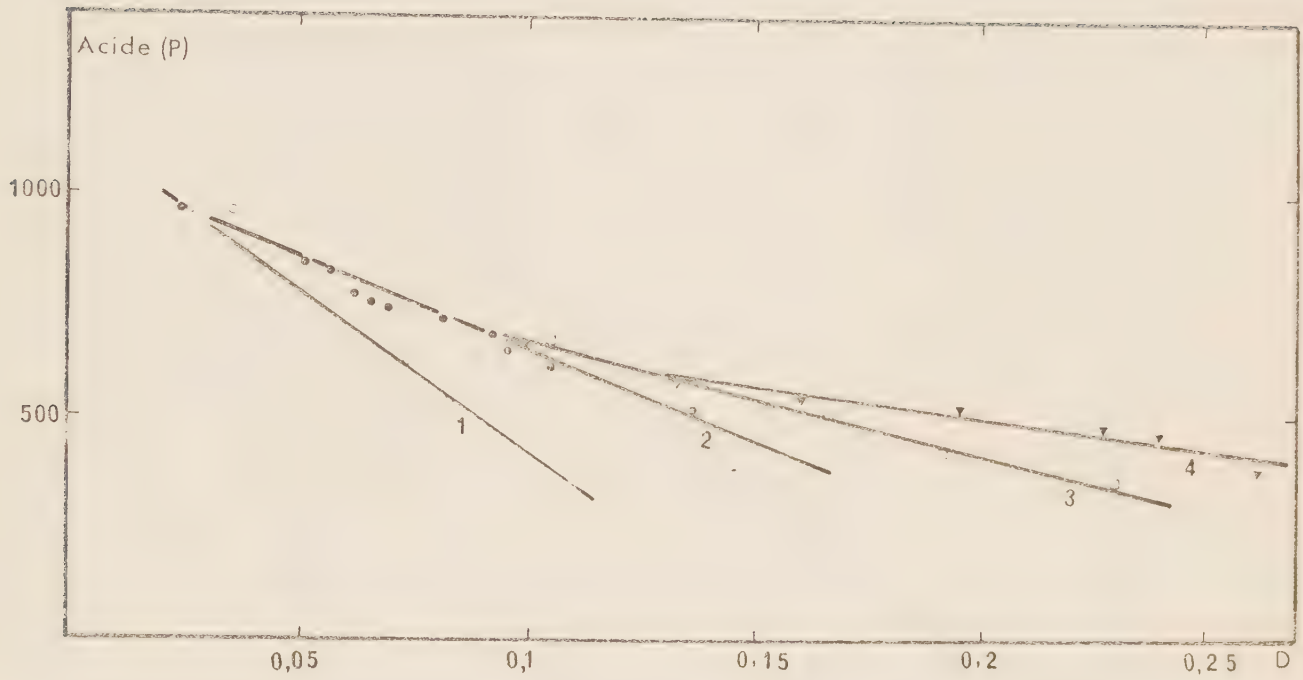

Fig. 12 a : *Valeur à l'état d'équilibre de l'acide acétique P en fonction du taux de dilution D et du total T (éthanol + acide acétique).*

droite n°1 ○——○ *1350* ≤ T ≤ *1215 m M/ℓ - Total moyen = 1288 m M/ℓ.*
droite n°2 ●——● *1070* ≤ T ≤ *910 m M/ℓ - Total moyen = 975 m M/ℓ.*
droite n°3 □——□ *880* ≤ T ≤ *819 m M/ℓ - Total moyen = 849 m M/ℓ.*
droite n°4 ▽——▽ *690* ≤ T ≤ *640 m M/ℓ - Total moyen = 660 m M/ℓ.*

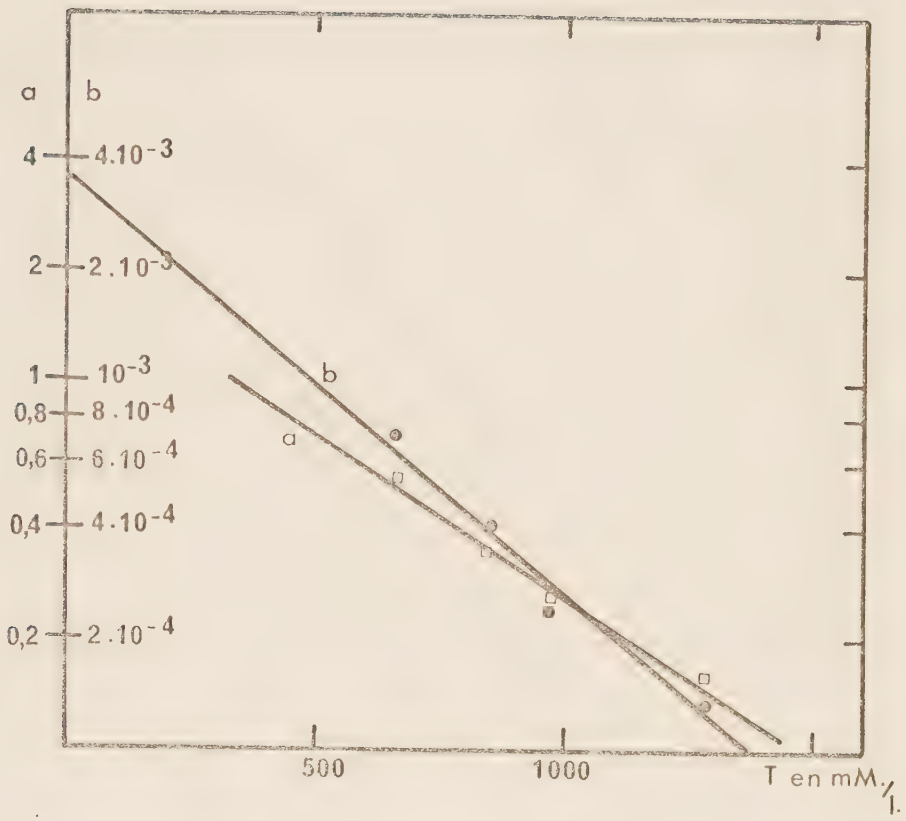

Fig. 12 b : *Valeur des coefficients a et b en fonction du total T (éthanol + acide acétique).*

Les coefficients a et b sont les coefficients des quatre droites de la figure 12 a ayant pour équation générale D = a - b P.

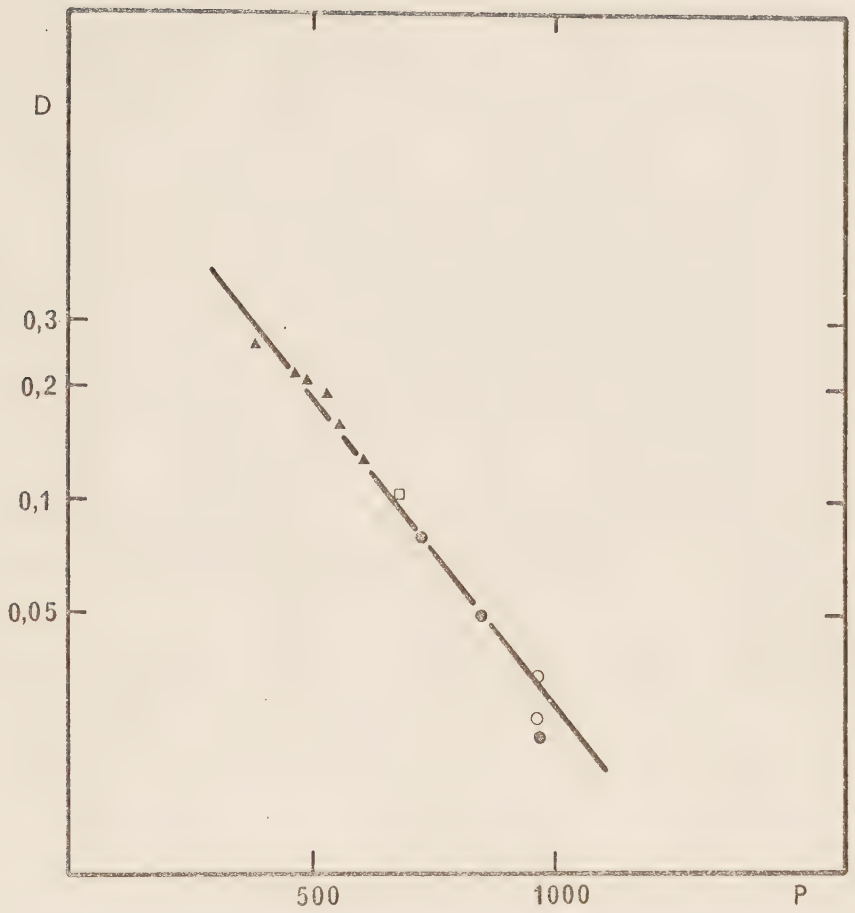

Fig. 13 : *Représentation de l'acidité maximale obtenue figure 12 a, en fonction du taux de dilution D.*

Les symboles sont identiques à ceux de la figure 12 a.

Les équations calculées graphiquement ont pour valeur :

Total moyen : 1288 mM/l : $D = 0,158 - 1,3 \ 10^{-4} \ P$
Total moyen : 975 mM/l : $D = 0,26 - 2,45 \ 10^{-4} \ P$
Total moyen : 849 mM/l : $D = 0,357 - 3,84 \ 10^{-4} \ P$
Total moyen : 660 mM/l : $D = 0,557 - 7,14 \ 10^{-4} \ P$

Sur la figure 12 a, nous avons porté la valeur des coefficients a, b de la famille des droites $D = a - b \ P$. Nous constatons qu'en fonction du total T représentant la somme de la quantité d'acétate et de la quantité d'éthanol pour l'intervalle choisi, a et b peuvent s'exprimer sous la forme : $a = a_o \ e^{-K_1 \ T}$ et $b = b_o \ e^{-K_2 \ T}$, l'équation générale de la famille des droites en fonction du total T et de la teneur en acide est donc :

$$D = a_o \ e^{-K_1 \ T} - P. \ b_o \ e^{-K_2 \ T}$$

ou encore en remplaçant les constantes par leurs valeurs :

$$D = 2 \ e^{-2,04 \ 10^{-3} \ T} - P. \ 3,5 \ 10^{-3} \ e^{-2,58 \ 10^{-3} \ T}$$

Si nous considérons les points de la figure 12 a pour lesquels on observe l'acidité maximale pour un taux de croissance donné, on constate (figure n° 13) que ces points entre D = 0,035 et D = 0,26 sont situés sur une droite, donc il répondent à une équation du type $D = e^{-KP}$, le calcul graphique donne $D = 1,27 \ e^{-3,86 \ 10^{-3} \ P}$.

- En culture continue le produit P x D représente la productivité du réacteur considéré c'est-à-dire la quantité d'acide acétique produite par litre et par heure. Nous avons représenté (figure 14) la productivité des réacteurs aux différents états d'équilibres obtenus. Les points situés sur la courbe enveloppe E représentent les états d'équilibres ayant une productivité maximale.

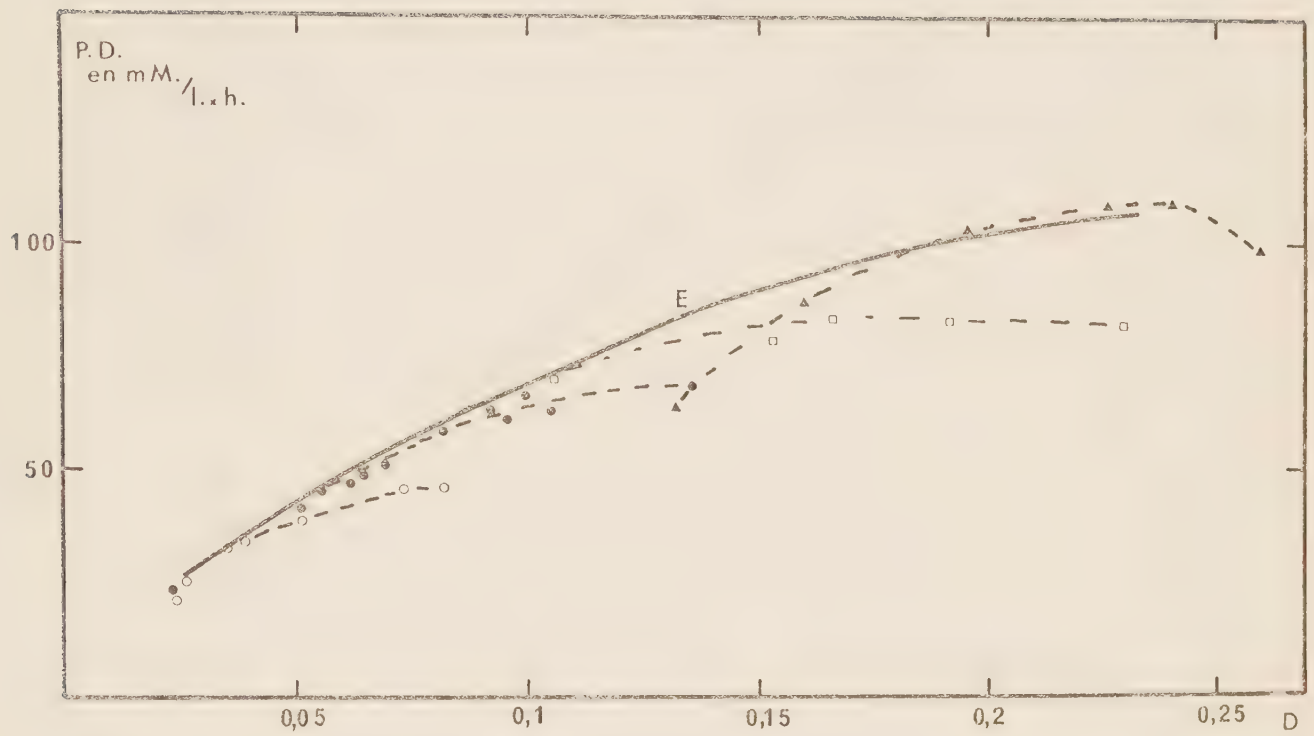

Fig. 14 : Représentation de la productivité (P x D) des réacteurs en fonction du taux de dilution D et du total T (alcool + acide acétique).

Les symboles utilisés pour différencier les points sont identiques à ceux de la figure 12 a. Les points situés sur la courbe E représentant ceux correspondant à la productivité maximale.

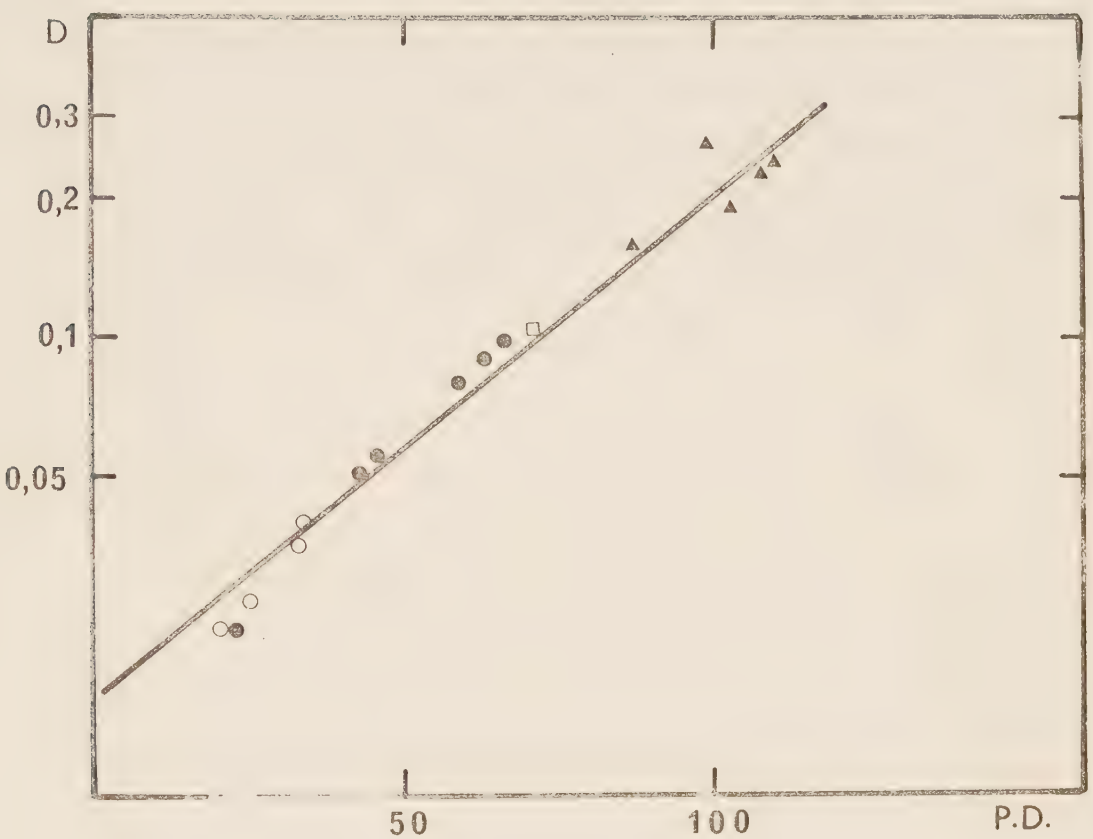

Fig. 15 : *Représentation en échelle semi-logarithmique des points correspondants à la productivité (P x D) maximale en fonction du taux de dilution D.*

Les explications sont identiques à celles de la figure 14.

Ces points répondent (figure n° 15) à une équation du type $D = m\, e^{h\,(P.D)}$ qui a pour valeur :

$$D = 16\ 10^{-3}\ e^{25,5\,10^{-3}\ P.\ D}$$

.

Sachant qu'une molécule d'oxygène sert pour la transformation d'une molécule d'éthanol en acide acétique, nous avons calculé pour chaque état d'équilibre la valeur du QO_2 exprimé en µl d'O_2 absorbé par heure et par mg de poids sec des bactéries. Nous avons représenté figure 16 la population microbienne obtenue pour chaque état d'équilibre et figure 17 les valeurs du QO_2 en fonction du taux de dilution D. Les points expérimentaux sont sensiblement situés sur trois droites ayant pour équations :

- droite 1 - $QO_2 = 38,5.10^3\ D$
- droite 2 - $QO_2 = 8,58.10^3\ D + 5\ 800$
- droite 3 - $QO_2 = 73,5.10^3\ D + 800$

D'après PIRT (1965) le rendement apparent d'une culture (Y) est relié au taux de croissance µ par une relation du type $\frac{1}{Y} = \frac{m}{\mu} + \frac{1}{Y_G}$. Nous avons représenté (figure 18 a et 18 b) $\frac{1}{Y}$ en fonction de $\frac{1}{D}$ pour le glucose et pour l'éthanol. Pour le calcul du rendement de l'éthanol, nous avons estimé que l'éthanol consommé était égal à l'acide acétique accumulé. Pour les deux substrats, glucose et éthanol, on constate que les points sont sensiblement alignés autour de 3 droites selon la teneur en éthanol et en acide acétique et selon le taux de dilution D. Nous avons porté (tableau III) la valeur de coefficients calculés, ainsi que le nombre de molécules d'ATP formées par molécule de substrat ayant servi à l'accroissement de la masse cellulaire, ce calcul est effectué d'après BAUCHOP et ELSDEN (1960) sachant que 1 mole d'ATP permet la synthèse de 10,5 g de matière cellulaire sèche.

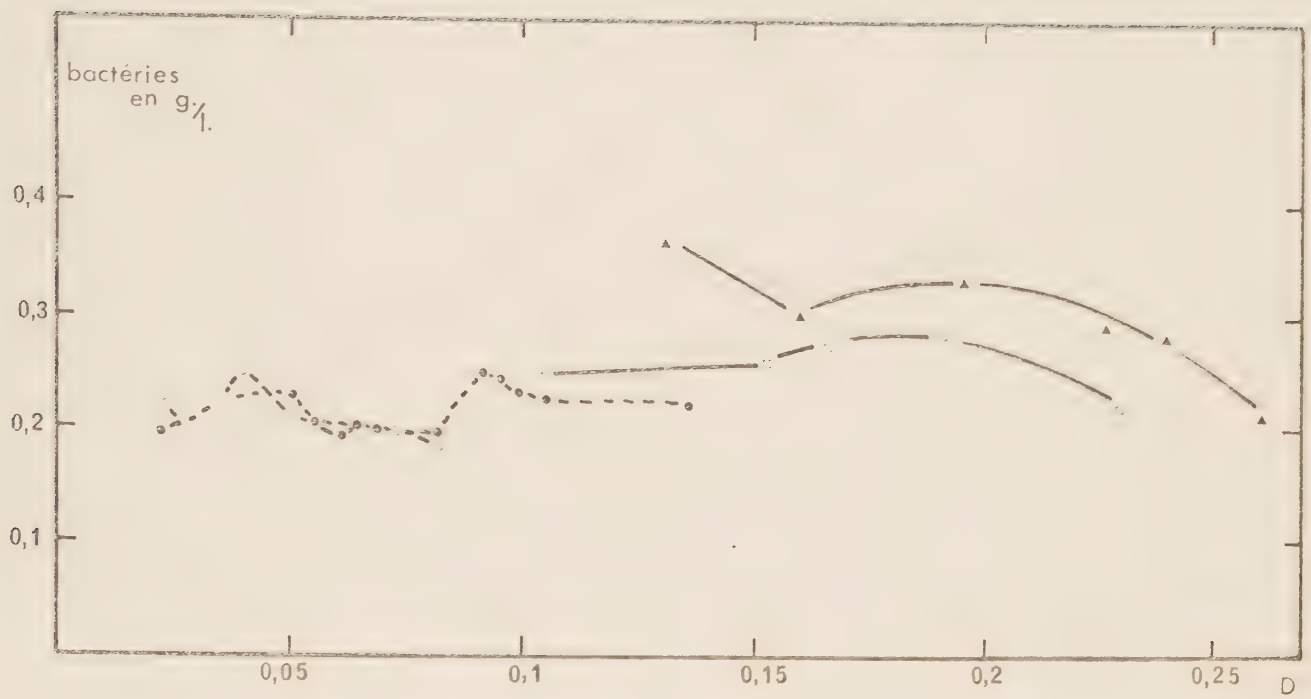

Fig. 16 : *Valeur de la population microbienne à l'état d'équilibre en fonction du taux de dilution D.*

Les symboles utilisés pour différencier les points sont identiques à ceux utilisés figure 12 a.

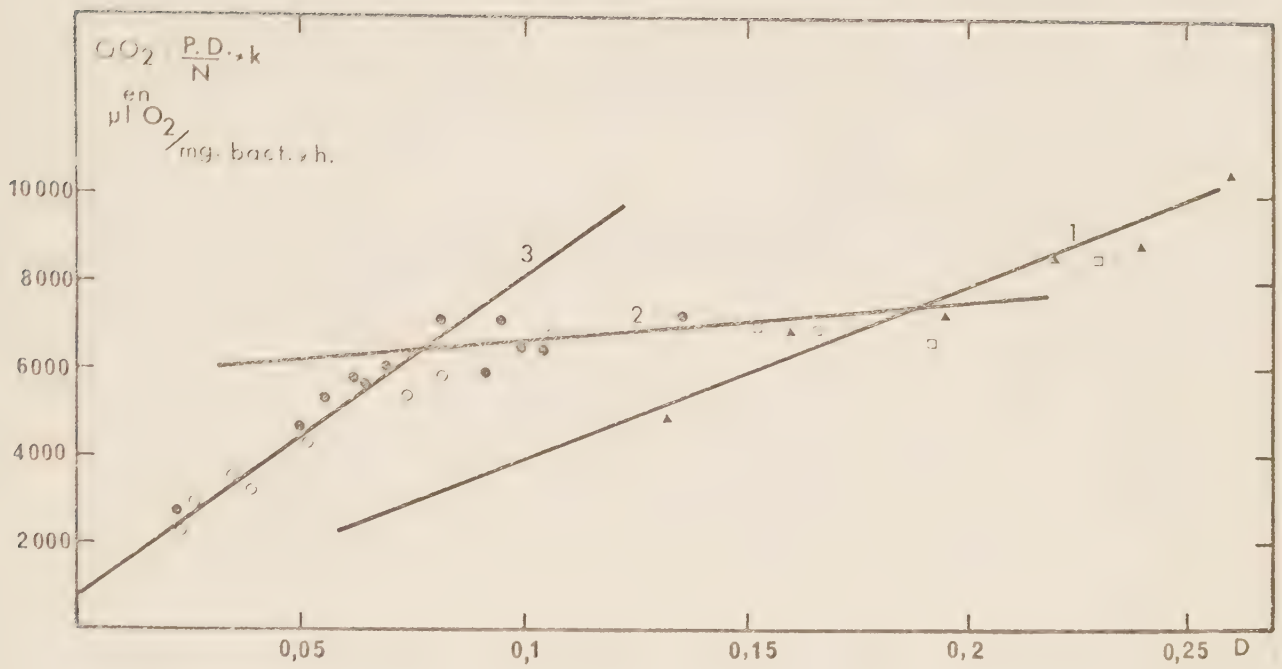

Fig. 17 : Relation entre la vitesse spécifique d'oxydation de l'éthanol (QO_2) et le taux de dilution D.

Nous avons vu dans le texte que $QO_2 = \frac{P.D}{N}K$

Droite n°1 $QO_2 = 38,5\ 10^3\ D$

Droite n°2 $QO_2 = 8,58\ 10^3\ D + 5\ 800$

Droite n°3 $QO_2 = 73,5\ 10^3\ D + 800$

Les symboles utilisés pour différencier les points sont identiques à ceux utilisés figure 12 a.

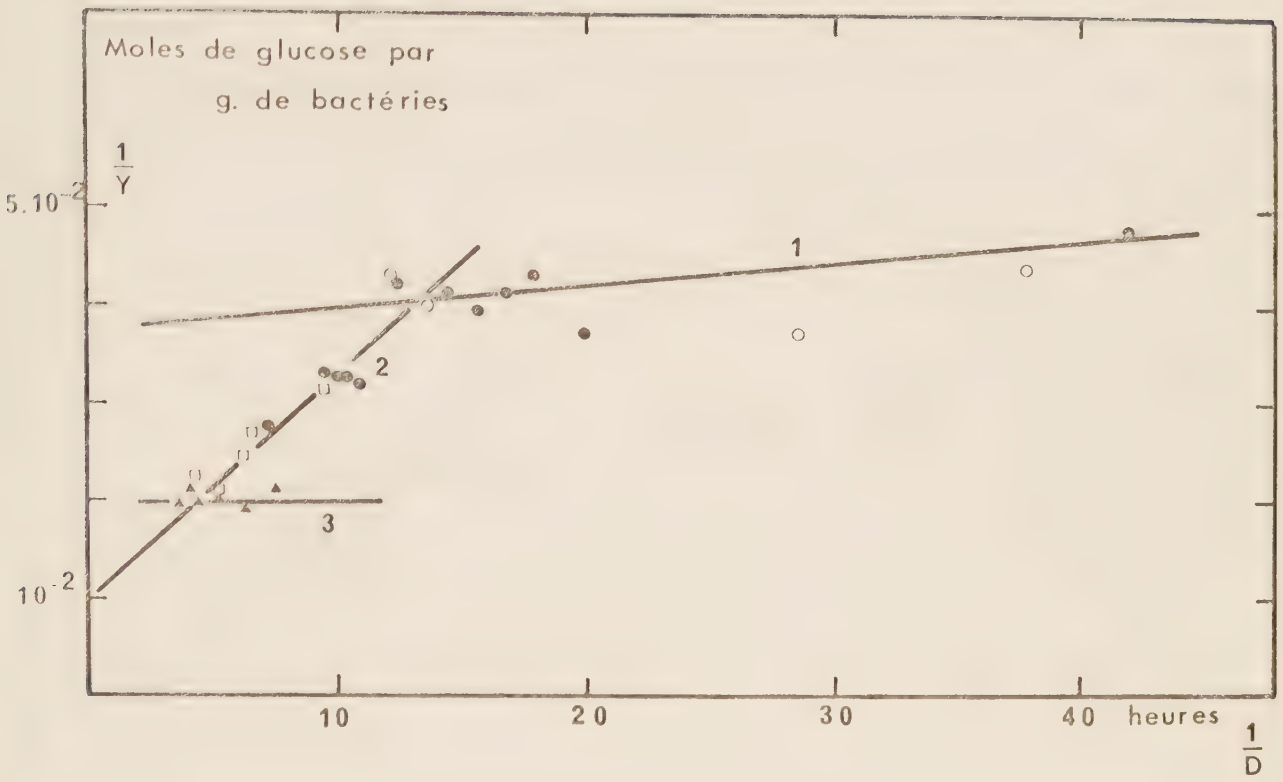

Fig. 18 a : Relation entre l'inverse du rendement apparent ($\frac{1}{Y}$) exprimé en grammes de cellules formées par mole de substrat oxydé et l'inverse du taux de dilution D.

a - Substrat étudié le glucose

Les symboles utilisés pour différencier les points sont identiques à ceux utilisés figure 12 a.

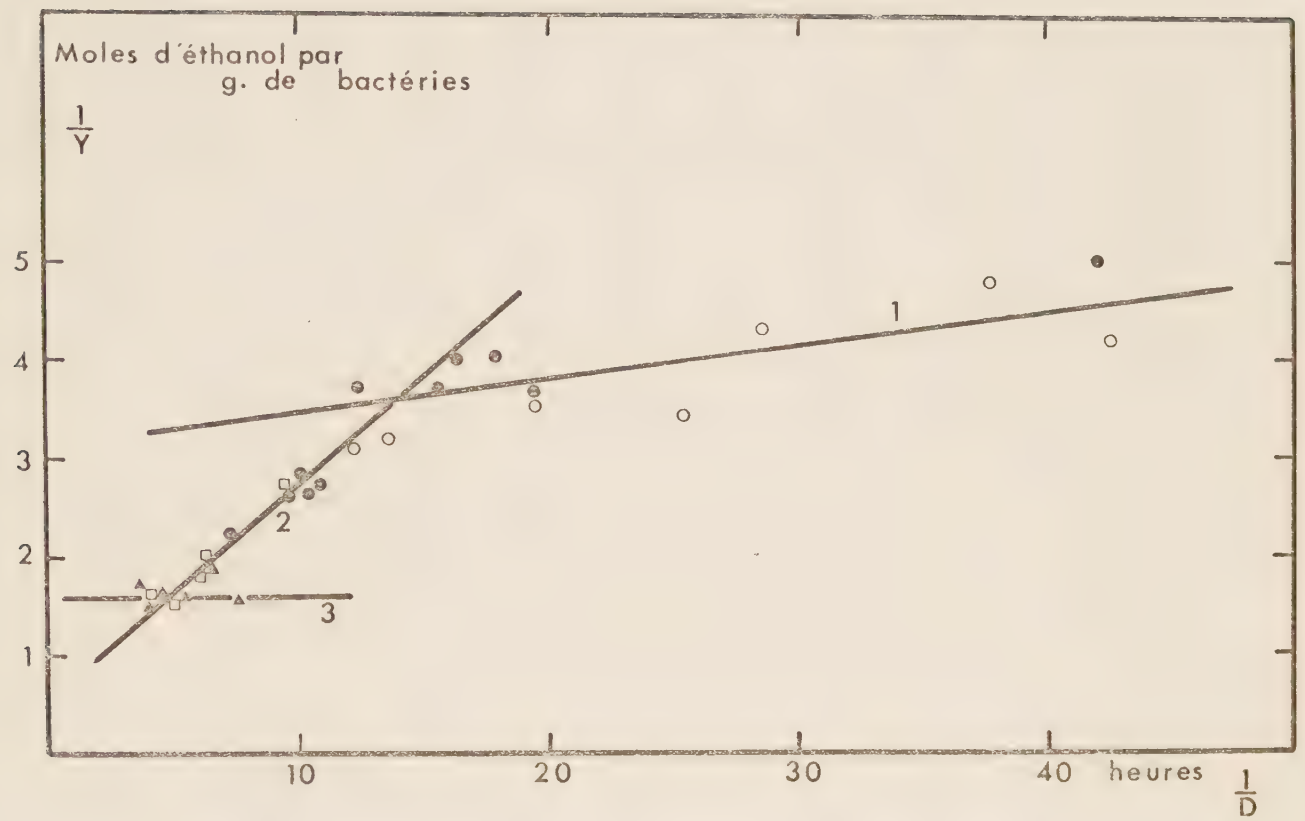

Fig. 18 b : Relation entre l'inverse du rendement apparent ($\frac{1}{Y}$) exprimé en grammes de cellules formées par mole de substrat oxydé et l'inverse du taux de dilution D.

b - Substrat étudié l'éthanol

Les symboles utilisés pour différencier les points sont identiques à ceux utilisés figure 12 a.

Calculs à partir des droites des figures numérotées 18 a et b	Substrat Ethanol		Substrat Glucose		Moles d'ATP formées par moles de substrat	
	Energie de maintien m en mM par gramme bactéries et par heure	Grammes de bactéries formées par mole de substrat (YG)	Energie de maintien m en mM par gramme bactéries et par heure	Grammes de bactéries formées par mole de substrat (YG)	Ethanol	Glucose
1	33	0,317	0,250	27,02	0,0301	2,57
2	222	2	2,3	100	0,190	9,52
3	0	0,625	0	50	0,0595	4,76

Tableau III. Valeurs de l'énergie de maintien, des coefficients de rendement (YG), des moles d'ATP formées par mole de substrat, calculées à partir des figures 18 a et 18 b.

3° - *Discussion et conclusion*

La production d'acide acétique est une transformation dans laquelle un des substrats c'est-à-dire l'éthanol et le produit de ce substrat, l'acide acétique sont inhibiteurs de la croissance des bactéries aux concentrations où ils sont utilisés.

Ainsi que l'ont montré ANDREWS (1968), YANO et KOGA (1969) et EDWARDS (1970), lorsque la croissance sera limitée par la toxicité du substrat en l'occurence l'éthanol, nous aurons un état d'équilibre instable et donc le lessivage de la culture pourra être produit par une variation minime de la population. Si l'on se réfère aux résultats que nous avons obtenus (figures n° 8, 9, 10, 11, 12), les variations observées dans la population excluent la possibilité que le taux de croissance soit seulement limité par la toxicité de l'éthanol. Les études des états d'équilibre limités par la toxicité des substrats ne peuvent être effectuées avec un chémostat mais avec un turbidostat.

Des variations observées au cours de cultures continues ont déjà été signalées dans la littérature. Ainsi DEAN et ROGERS (1967) ont constaté que l'introduction de m-crésol dans le milieu de croissance d'*Aerobacter aerogenes* entraînait des perturbations dans la population pendant une vingtaine de générations. En culture continue de *Saccharomyces cerevisiae* avec l'éthanol comme substrat carboné, MOR et FICHTER (1968) ont constaté des oscillations pendant quelques dizaines d'heures après un changement brusque du taux de dilution.

RAMKRISHNA et al (1967) ont proposé des modèles mathématiques tenant compte à la fois d'un inhibiteur et de la composition différente que peuvent prendre les cellules au cours de leur croissance. Si l'on considère

la masse cellulaire comme formée de deux groupes de substances réagissant différemment aux conditions du milieu, les auteurs ont prévu que le lessivage de la culture peut-être provoqué quelque soit le temps de séjour, cela dépend essentiellement des conditions initiales (composition des cellules) lors des changements de dilution. D'autre part, des oscillations pratiquement non amorties peuvent avoir lieu avant d'atteindre un état d'équilibre stable. Dans d'autres cas, les oscillations seront accentuées avant le lessivage de la culture.

Il apparaît que le modèle présenté par RAMKRISHNA et al (1967) puisse expliquer une partie des phénomènes que nous avons constatés. Ainsi pour un total d'éthanol et d'acide acétique de 1000 mM/l le brusque passage de D = 0,027 à D = 0,134 entraîne le lessivage de la culture alors que le passage de D = 0,027 à D = 0,04 puis 0,04 à 0,134 n'entraîne pas le lessivage de la culture.

Comme le prévoit la théorie, aux faibles taux de dilution (figure n° 8), lorsque la concentration en produits inhibiteurs augmente, nous constatons des variations importantes dans l'acidité atteignant 63 %. Les variations observées dans la population sont du même ordre de grandeur. Ces variations sont moins accusées pour les taux de dilution plus importants (figure n° 9).

Dans la figure n° 8, considérons le rapport $\frac{P}{N}$, représentant le rapport de la concentration d'acide (P) en mM/l divisée par la population bactérienne (N) exprimée en densité optique, comparé avec les fluctuations de la population et de l'acidité. Nous constatons un léger décalage dans les maxima, ce décalage est accentué (figure n° 9). Figure n° 8, les bactéries sont les plus actives au début de la diminution de la population. Dans tous les cas observés, le calcul montre que nous n'avons pas une

simple dilution de la population bactérienne mais un ralentissement apparent dans la multiplication. Ainsi, entre la 384e heure et la 416e heure, la densité optique passe de 0,54 à 0,4. Ce qui représente pour le coefficient de dilution D = 0,0136 et d'après la formule

$$\frac{\text{Log } x_2 - \text{Log } x_1}{t_2 - t_1} + D = \mu$$

(MONOD, 1950) dans laquelle x représente la densité optique et t le temps, un taux de croissance népérien apparent égal à 0,0042.

On constate de même que le synchronisme entre la multiplication cellulaire et la production d'acide acétique n'est pas observé pour les autres taux de dilution (figure n° 9, 10, 11, 12). Pour les taux de dilution plus élevés (figure n° 11) on observe que l'acidité reste pratiquement constante alors que les variations observées dans la population sont encore importantes.

Si l'on veut optimaliser en culture continue la transformation de l'éthanol en acide acétique, il faut nécessairement se placer dans les conditions où l'acide acétique n'est pas oxydé. Ce sera le cas lorsque l'éthanol ne constituera pas le facteur nutritif limitant. Nous avons vu (figures 5 et 6) que pour D = 0,026 et une teneur en acide voisine de 800 mM/l, l'oxydation de l'acide acétique accumulé se produira lorsque l'alcool ne sera plus présent dans le milieu de culture. Pour des concentrations voisines de 1 M/l, pour un taux de dilution égal à 0,026, sur une période de 200 heures, nous n'avons pas observé l'oxydation de l'acide acétique accumulé. Pour éviter l'oxydation de l'acide acétique, il faudra donc opérer dans les conditions où l'éthanol n'est pas limitant et dans ce cas

si le milieu nutritif est convenablement ajusté, ce sera l'acide acétique produit qui limitera la population. Ou bien il conviendra de se placer dans des conditions où l'acide acétique produit sera inhibiteur de sa propre oxydation lorsqu'il n'y aura plus d'éthanol dans le milieu de culture.

Dans les cas que nous avons consignés dans le tableau II, il est vraisemblable que l'acide acétique produit pour un même total (T) consitute le facteur limitant puisque une augmentation des autres éléments nutritifs, glucose, extrait de levures n'augmente pas sa teneur. Dans ce cas là, il apparaît que le coefficient de dilution D est lié à la teneur en acide (P) par une relation du type $D = a - b\,P$ lorsque le total T représentant l'éthanol plus l'acide demeure constant. Notons qu'HINSHELWOOD (1952) a déjà proposé une équation de ce type pour décrire l'effet de l'éthanol sur une culture de *Bacterium lactis aerogenes*. Lorsque l'on tient compte du total (alcool + acide) l'équation dans l'intervalle étudié se met sous la forme :

$$D = a_o\, e^{-K_1 T} - P.\, b_o\, e^{-K_2 T}$$

Pour un taux de dilution donné, il existe donc une valeur optimale d'acide acétique produit. Dans notre expérience cette valeur est fonction du total T. Ainsi pour optimaliser la production d'acide acétique il faut se placer dans les conditions de productivité décrites par la courbe E (figure n° 15). Dans l'expérimentation que nous avons effectuée la productivité optimale obtenue est de 109,68 mM d'acide formé par litre de milieu de fermentation et par heure, lorsque la concentration totale est de 640 mM/l et le taux de dilution égal à 0,24. Nous retrouvons avec *A. mesoxydans* la constatation déjà effectuée avec *A. xylinum* à savoir que la production d'acide est liée à la croissance des bactéries par une relation du type :

$$QO_2 = \frac{P \times D}{N} \cdot \quad K = a\,D + b$$

a et b prenant différentes valeurs selon le taux de dilution D et la teneur totale en acide plus éthanol. Dans l'industrie, le production d'acide acétique est réalisée jusqu'à une teneur totale d'acide acétique de 1 500 à 2 000 mM/l. Si l'on veut optimaliser la production d'acide acétique par le moyen de la culture continue, il faut opérer d'après notre étude à des concentrations totales inférieures donc réaliser la production en plusieurs étapes en tenant compte des contraintes suivantes : l'éthanol ne doit pas constituer l'élément nutritif limitant avant que l'acide acétique produit ne soit inhibiteur de sa propre oxydation. D'autre part, si l'on opère avec des dilutions trop faibles, il y aura (figure n° 8) des oscillations qui ne donneront pas un produit final homogène.

Le calcul des rendements de transformation du glucose et de l'éthanol montre pour ces deux substrats trois phases distinctes (figures n° 18 A, 18 B, tableau III). On constate qu'aux faibles taux de dilution, inférieurs à 0,07, l'énergie de maintien utilisée par les cellules est inférieure à celle utilisée lorsque le taux de croissance est supérieur. Notons qu'un tel fait a déjà été signalé par HEMPFLING et VISHNIAC (1967) pour *Thiobacillus neapolitanus* en culture sur thiosulfate et par EDWARDS et al (1970) pour *Candida utilis* en culture sur acétate.

Lorsque la concentration totale est de 640 à 690 mM/l, on constate pour les taux de dilution étudiés variant de 0,132 à 0,262 que l'énergie de maintien est nulle pour les deux substrats.

Pour les trois phases considérées, on remarque que le rendement de transformation du glucose est particulièrement bon à la différence de l'éthanol. Les chiffres obtenus avec le glucose sont du même ordre de grandeur que

ceux déjà obtenus pour les bactéries aérobies avec un seul substrat carboné (PIRT, 1965), ce qui indique que le glucose est entièrement transformé par les bactéries acétiques dans ces conditions de culture.

Nous savons depuis l'étude de STOUTHAMER (1960) sur *Gluconobacter liquefaciens* que l'énergie produite sous forme d'ATP dans l'oxydation des substrats par les enzymes particulaires est très faible. Ainsi cet auteur a mesuré que la transformation de l'éthanol en acétate entraîne la formation de 0,2 moles d'ATP par mole de substrat. C'est sensiblement le chiffre que nous trouvons dans le meilleur des cas (droite n° 2, figure n° 18 B), pour des cellules en croissance dans le cas de la production d'acide acétique.

CHAPITRE III

LES ALCOOL ET ACETALDEHYDE DESHYDROGENASES. MECANISME DE LA PRODUCTION D'ACIDE ACETIQUE.

-

A/ LES RESULTATS ACQUIS ANTERIEUREMENT

I - *Difficulté de l'étude des enzymes chez les Acétobacter*

Les premiers auteurs qui au début du XXe siècle ont voulu étudier le mécanisme de la production d'acide acétique ont cherché à utiliser les méthodes qui avaient déjà donné des résultats dans l'étude de la fermentation alcoolique.

En 1897, BÜCHNER était parvenu à extraire de la levure un suc capable de provoquer la même réaction de fermentation que les levures vivantes. La préparation de BÜCHNER avait deux avantages principaux, d'abord affranchir l'opérateur des phénomènes de diffusion à travers la membrane cellulaire, ensuite permettre la séparation ultérieure des diverses enzymes contenues dans les cellules.

Dès 1903, BÜCHNER et MEISENHEIMER ont voulu appliquer aux *Acetobacter* la technique qui leur avait si bien réussi avec les levures. Les *Acetobacter* ne donnèrent après trituration avec du quartz, aucun extrait actif. Les essais répétés par ROTHENBACH et EBERLIN (1905) n'ont fait

que confirmer ces résultats.

On peut regretter que BÜCHNER ayant le souci d'éviter le développement des bactéries dans son extrait y ait ajouté du toluène, 4 cm^3 pour 120 cm^3 de milieu. On sait en effet par les travaux de TAMIYA et TANAKA (1930) que le toluène est un inhibiteur des réactions aérobies produites par les *Acetobacter*. On doit considérer que l'échec de BÜCHNER est dû uniquement à cette précaution.

A la suite de cette expérience, l'opinion qu'il était impossible d'obtenir des extraits enzymatiques par broyage des *Acetobacter* s'est imposée et a retardé de 50 ans de nouvelles tentatives.

Ainsi, en 1906, l'étude de BÜCHNER et GAUNT consacrée à l'oxydation de l'alcool, a-t-elle été réalisée avec des poudres acétoniques.

En 1928, WIELAND et BERTHO se heurtèrent à la même impossibilité d'extraire les enzymes bien qu'ils aient essayé les moyens déjà utilisés avec succès pour d'autres microorganismes. Voici d'ailleurs ce qu'ils disaient à ce sujet :

"Nous eussions préféré libérer par autolyse le ferment déshydrogénant, mais la résistance extraordinaire de la membrane ne nous l'a pas permis. On n'a pu obtenir d'extraits actifs ni avec le toluène, ni avec le chloroforme, l'éther acétique ou le chlorure de sodium. On ne l'a pas obtenu davantage après congélation des microbes dans un courant d'air. Ces bactéries sont si résistantes, qu'une récolte lavée que l'on avait laissé autolyser pendant 3 mois dans de l'eau physiologique était encore capable d'oxyder l'alcool. Le liquide, par contre, s'est montré entièrement inactif."

Il est probable que nous ne connaissons pas tous les essais infructueux, parce que bon nombre d'auteurs doivent avoir négligé de les rapporter dans leurs mémoires.

Ainsi, en 1949, malgré les grands progrès réalisés dans l'extraction des enzymes, deux auteurs autrichiens, HROMATKA et EBNER, qui ont repris l'étude de la production d'acide acétique indiquent qu'on en est réduit à utiliser des bactéries non proliférantes ou bien des poudres acétoniques.

Les premières préparations enzymatiques actives ont été obtenues sur A. *suboxydans* qui sont des bactéries acétiques moins résistantes que les autres types de bactéries acétiques. Toutefois, KING et CHELDELIN (1954) signalent les difficultés qu'ils ont eu pour préparer des extraits enzymatiques. La méthode qui convient le mieux est celle adoptée par Mc ILWAIN (1948) ou HAYAISHI et STANIER (1951) qui consiste à broyer les cellules lyophilisées en présence de poudre d'alumine dans un tampon phosphate pH 7, à une température voisine de 0°C.

Par la suite, de nombreux auteurs dont KING (1966) utilisèrent le broyage aux ultra-sons.

II - Les alcool et acetaldehyde deshydrogénases des bactéries acétiques

En 1913, WIELAND découvrait que l'oxygène qui intervient dans l'oxydation de l'alcool en acide peut être remplacé par une autre substance jouant le rôle d'accepteur d'hydrogène tel le bleu de méthylène et la quinone (WIELAND et BERTHO, 1928). Lorsque le bleu de méthylène est utilisé, l'oxydation est plus lente que lorsque l'oxygène ou la quinone sont utilisés. Des expériences sur la cinétique de ces déshydrogénations sont rapportées par WIELAND et BERTHO

(1928) qui ont utilisé les trois accepteurs suivants : bleu de méthylène, thionine, quinone.. Par la suite COZIC (1933) montre que ces accepteurs étaient non seulement capables d'entraîner l'oxydation de l'éthanol, mais encore de permettre la croissance des bactéries acétiques en l'absence d'oxygène.

Pour savoir si les enzymes responsables de la déshydrogénation sont les mêmes que celles qui agissent en aérobiose BERTHO (1932) a eu l'idée de mettre en compétition comme accepteurs d'hydrogène, l'oxygène et la quinone et il en déduit que le système enzymatique actif en aérobiose et en anaérobiose est le même.

TAMIYA et TANAKA (1930) montrent que le CO inhibe l'oxydation de l'éthanol avec l'oxygène mais pas avec la quinone. La réduction du 2,6 dichlorophenolindophenol est aussi inhibée par le CO. L'inhibition par le CO est supprimée par la lumière.

On est donc amené à penser dès cette époque que comme pour la respiration des plantes et des animaux. les cytochromes doivent jouer un rôle important dans l'oxydation de l'éthanol par les bactéries acétiques.

Les premiers résultats obtenus sur les déshydrogénases des bactéries acétiques concernent les déshydrogénases dont le fonctionnement requiert la présence de NAD ou de NADP.

1° - Les alcool et acétaldehyde déshydrogénases liées au NAD ou NADP

KING et CHELDELIN (1954) sont parvenus les premiers à purifier l'alcool deshydrogénase liée au NAD chez A. *suboxydans* jusqu'à 14 000 unités RACKER/mg de protéines.

Pour TANNENBAUM (1956) l'éthanol déshydrogénase d'A. *peroxydans* est couplée au NAD et non au NADP comme l'a montré ATKINSON (1956).

KIDA et ASAI (1968) montrent que A. *dioxyacetonicus* possède une éthanol déshydrogénase spécifique du NADP.

D'après RAO et GUNSALUS (1955) l'éthanol déshydrogénase d'A. *aceti* fonctionne avec le NAD.

Récemment, WYSS et ETTLINGER (1969) ont analysé 18 souches de bactéries acétiques appartenant aux espèces A. *aceti*, A. *rancens*, A. *mesoxydans*, A. *xylinum*, et *Acetomonas oxydans*. Ils concluent que toutes les espèces possèdent une activité éthanol déshydrogénase liée au NAD mais que, *Acetomonas oxydans* oxyde l'éthanol par une déshydrogénase liée au NADP, de même qu'A. *xylinum* ; A. *aceti* a une faible activité deshydrogénase liée au NADP, par contre A. *rancens* et A. *mesoxydans* n'ont pas d'activité décelable liée au NADP.

Chez *Gluconobacter oxydans* (*suboxydans*) souche SU (NCIB 9108), KERSTERS et de LEY (1966 a, b) ont pu isoler deux activités liées au NAD, une spécifique des alcools primaires, l'autres spécifique des alcools secondaires. C'est la seule étude dont nous disposons sur la spécificité de ces déshydrogénases.

En ce qui concerne les aldéhyde - déshydrogénases RAO et GUNSALUS (1955) ont montré chez A. *aceti* qu'il existe deux acétaldehyde - déshydrogénases solubles liées respectivement au NAD et au NADP.

Chez A. *suboxydans*, KING et CHELDELIN (1956) sur un extrait purifié 100 fois ne sont pas arrivés à séparer les activités liées au NAD et au NADP. Cette enzyme requiert essentiellement le NADP toutefois, le NAD est quatre fois moins actif. Le pH optimum pour les deux coenzymes est de 8,7. Son activité d'oxydation est de 100 pour l'acétaldehyde, 50 pour la propionaldehyde, 25 pour le n-butylaldehyde et sans action sur la glycéraldehyde. L'action différente de l'iodosobenzoate et Zn^{++} suggère que les sites de l'enzyme pour le NAD et le NADP sont différents. On signale en général que l'aldéhyde déshydrogénase est sensible aux produits réagissant avec les groupements SH, ce qui semble vérifié chez A. *suboxydans*.

NAKAYAMA (1960) a étudié chez une souche de bactéries acétiques A. *species*, voisine d'après ASAI (1968) d'A. *suboxydans*, l'acétaldéhyde déshydrogénase liée au NADP spécifiquement. Une purification de 200 fois a été effectuée.

Comme l'acétaldéhyde déshydrogénase étudiée par KING et al (1956), elle est sans action sur le glycéraldéhyde à la différence de l'aldéhyde déshydrogénase des levures. D'après cet auteur le groupement SH serait un groupement actif mais l'action inhibitrice de l'hydroxylamine l'amène à penser à un groupement aldéhyde dans le site actif.

2° - *Alcool et acétaldehyde déshydrogénases particulaires*

Les cellules non proliférantes des bactéries acétiques oxydent l'éthanol avec la même intensité entre pH 3 à pH 7.

PRIEUR (1957) montre qu'il existe chez A. *xylinum* deux types d'alcool déshydrogénases, une à pH optimum de 5,7 ne requérant pas le NAD et l'autre à pH optimum de 8,1 liée au NAD. On prit l'habitude de nommer l'alcool

déshydrogénase fonctionnant à pH acide : alcool déshydrogénse particulaire.

NAKAYAMA (1961, b) solubilise et purifie partiellement cette enzyme d'un facteur de 100. L'analyse du spectre montre que l'enzyme est vraisemblablement liée au cytochrome 553. C'est pourquoi, le nom de alcool-cytochrome 553 réductase est proposé. Jusqu'à ce jour l'isolement des différents composants de cette enzyme n'a pas été effectué. L'alcool cytochrome 553 réductase peut réduire des accepteurs de 1 ou deux électrons, D.I.P, ferricyanure, P.M.S, thionine et bleu de méthylène.

KERSTERS et de LEY (1966, a) confirment ces résultats en montrant que *Gluconobacter oxydans* contient en outre une (ou des) polyol déshydrogénase particulaire ainsi qu'une (ou des) alcool secondaire déshydrogénase particulaire.

D'après NAKAYAMA (1961, b) il y aurait un groupement carbonyl dans le site actif de l'enzyme.

Les résultats de KERSTERS et de LEY (1966, b) ne confirment pas cette hypothèse, puisque ces auteurs ont montré que l'hyamine et le semicarbazide ne sont pas des inhibiteurs.

Cependant, la présence de l'éthanol déshydrogénase particulaire a été confirmée chez toutes les bactéries acétiques (DUPUY et MAUGENET, 1962).

Il semble que l'on rencontre aussi chez toutes les bactéries acétiques une aldéhyde déhsydrogénase particulaire. NAKAYAMA (1961, a) montre que cette déshydrogénase qu'il a solubilisée et partiellement purifiée pouvait utiliser comme accepteur d'électrons le ferricyanure, le D.I.P et le bleu de méthylène. Sa spécificité est assez

étroite. A la différence de l'aldéhyde oxydase du foie de porc étudiée par GORDON et al (1940) elle oxyde l'acétaldéhyde, le propionaldéhyde, le n-butylaldéhyde, la crotonaldéhyde avec la même intensité. Son pH optimum est de 6.6.

III - Les alcool et acétaldéhyde déshydrogénases chez d'autres espèces

Les connaissances sur l'alcool déshydrogénase soluble des bactéries acétiques sont peu développées, on connait mieux l'éthanol déshydrogénase des levures et celle isolée de tissus de mammifères.

L'alcool déshydrogénase des levures réagit spécifiquement avec le NAD. Une faible activité des préparations cristallisées d'ADH'se pour le NADP résulterait d'une contamination avec ADH'se fonctionnant avec le NADP (RACKER, 1955). Chez les levures la présence d'une éthanol déshydrogénase fonctionnant avec le NADP n'a reçu encore aucune confirmation à notre connaissance.

Chez *Euglena gracilis* (HURLBERT et RITTENBERG, 1962 ; DANFORTH et al, 1966) on a pu montrer qu'il existe une éthanol déshydrogénase liée au NAD et NADP.

Chez *Astasia longa* de même, BEGIN-HEICK et HEICK (1970) ont montré par électrophorèse une activité liée au NAD et une activité liée au NADP.

En ce qui concerne les activités liées au NAD, des isozymes ont été montrées dans des préparations enzymatiques provenant de multiples sources, le foie de cheval (PIETRUSZKO et al, 1969), la Drosophile (URSPRUNG et al, 1968) les levures (SCHIMPFESSEL, 1968 ; LUTSTORF et MEGNET, 1968 ; HEICK et al, 1969).

L. starkevi (HEICK et BARRETTE, 1970) présente une grande similitude avec *S. cerevisiae* (HEICK et al, 1969).

Chez *S. cerevisiae*, la croissance sur éthanol s'accompagne d'une éthanol déshydrogénase liée au NAD qui est virtuellement absente lors de la croissance sur glucose. Cette enzyme a été dénommée ADH II. Elle présente une forte affinité pour les alcools supérieurs tout particulièrement pour le butanol et l'octanol (WIAME, 1965).

La cinétique d'inactivation thermique est différente entre l'éthanol déshydrogénase provenant de culture sur éthanol et celle provenant de culture sur glucose (SCHIMPFESSEL, 1968).

BÜHNER et SUND (1969) ont déterminé la structure de l'alcool déshydrogénase des levures. Ils concluent que l'activité de l'ADH de levure cristllisée est fonction du nombre de groupements SH. La protéine native a un poids moléculaire de 141 000 et elle est formée de 4 polypeptides de P.M. 35 000. La formation de groupes S-S ne peut pas se produire entre des polypeptides différents.

L'alcool déshydrogénase du foie de cheval a un poids moléculaire de 71 000 (THEORELL et BONNICHSEN, 1951). Chaque molécule possède deux sites actifs, ces deux sites sont indépendants et équivalents ce qui implique deux moitiés identiques (TANIGUCHI et al, 1967). On connait trois groupes d'izozymes avec des spécificités de substrat différentes (JORNVALL, 1970). Chacun correspond à un dimère de deux chaines de protéines. Les expériences de dissociation et de réassociation montrent que les deux chaines ne sont pas interconvertibles.

Les acétaldehyde - déshydrogénase ont été jusqu'à présent beaucoup moins étudiées que les alcool - déshydrogénases.

L'oxydation de l'éthanol chez la levure avec formation d'acétate a conduit BLACK (1951) à la découverte d'une aldéhyde déshydrogénase spécifique des aldéhydes aliphatiques et donc capables d'oxyder l'acétaldehyde en acétate, cette enzyme fonctionne avec le NAD et accessoirement avec le NADP et exige la présence d'ions K^+. On connait de même une acétaldehyde déshydrogénase (SEEGMILLER, 1955) fonctionnant avec le NADP et exigeant la présence d'ions Mg^{++}.

Le rôle physiologique de ces deux enzymes n'est pas clair.

B/ RESULTATS EXPERIMENTAUX

I - *Etude de l'oxydation de l'éthanol par les enzymes particulaires d'A. rancens*

Les travaux de PRIEUR (1957-1960) et NAKAYAMA (1961, a, b) ont montré que les bactéries acétiques possèdent une éthanol déshydrogénase particulaire, et une acétaldehyde déshydrogénase particulaire. Toutefois, en se basant sur des résultats d'inhibition, on peut penser que les particules peuvent effectuer la réaction :

$$\text{éthanol} + O_2 \longrightarrow \text{acide acétique} + H_2O$$

sans passer par le stade acétaldehyde facilement accessible. En effet, si avec les bactéries acétiques, NEUBERG et NORD (1919) sont parvenus à transformer l'éthanol en éthanal, c'est en opérant dans un milieu proche de la neutralité en présence de sulfite de calcium. Dans ces conditions on peut supposer que le système particulaire ne fonctionne pas seul. A pH acide de 3,8 DUPUY (1958, a) a montré que l'éthanal et sa combinaison bisulfitique se forme en faible quantité. Cette voie déviée du métabolisme ne représente qu'une valeur infime par rapport à l'acétate formé soit environ une fraction de $\frac{1}{250}$.

De même en présence de dimédon à la concentration de 1 mg/ml l'oxydation de l'éthanol par les particules d'A. *rancens* se poursuit jusqu'à son terme.

Ainsi, avec ou sans dimédon, on observe l'oxydation totale de 2 µmoles d'éthanol par la méthode manométrique de WARBURG.

Oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde en fonction du pH (figure n° 19)

L'on constate que les particules sont capables d'oxyder l'éthanol et l'acétaldéhyde, le pH optimum est voisin de 5 pour l'oxydation de l'éthanol et de 6 pour le pH optimum de l'acétaldehyde. Ces résultats sont identiques à ceux que de LEY et SCHELL (1959) ont obtenu avec les particules d'A. *peroxydans*, N.C.I.B 8618.

La culture en fonction du substrat carboné change l'intensité relative des courbes sans en changer la forme. Aussi après culture avec le lactate comme substrat carboné, les activités des éthanol et acétaldéhyde - déshydrogénases sont inférieures à celles obtenues après une culture ayant l'éthanol comme substrat carboné. Nous reviendrons sur cette étude avec A. *aceti* qui présente l'avantage de se développer sur un milieu mieux défini.

Oxydation de l'éthanol en fonction de sa concentration en présence de différentes doses d'acétaldéhyde (figure 20)

On constate que l'oxydation conjointe de l'acétaldéhyde et de l'éthanol n'entraîne pas une oxydation dont l'intensité est égale à la somme de l'oxydation des deux substrats pris chacun séparément. Pour préciser quelles sont les parts respectives revenant à l'oxydation de l'éthanol et

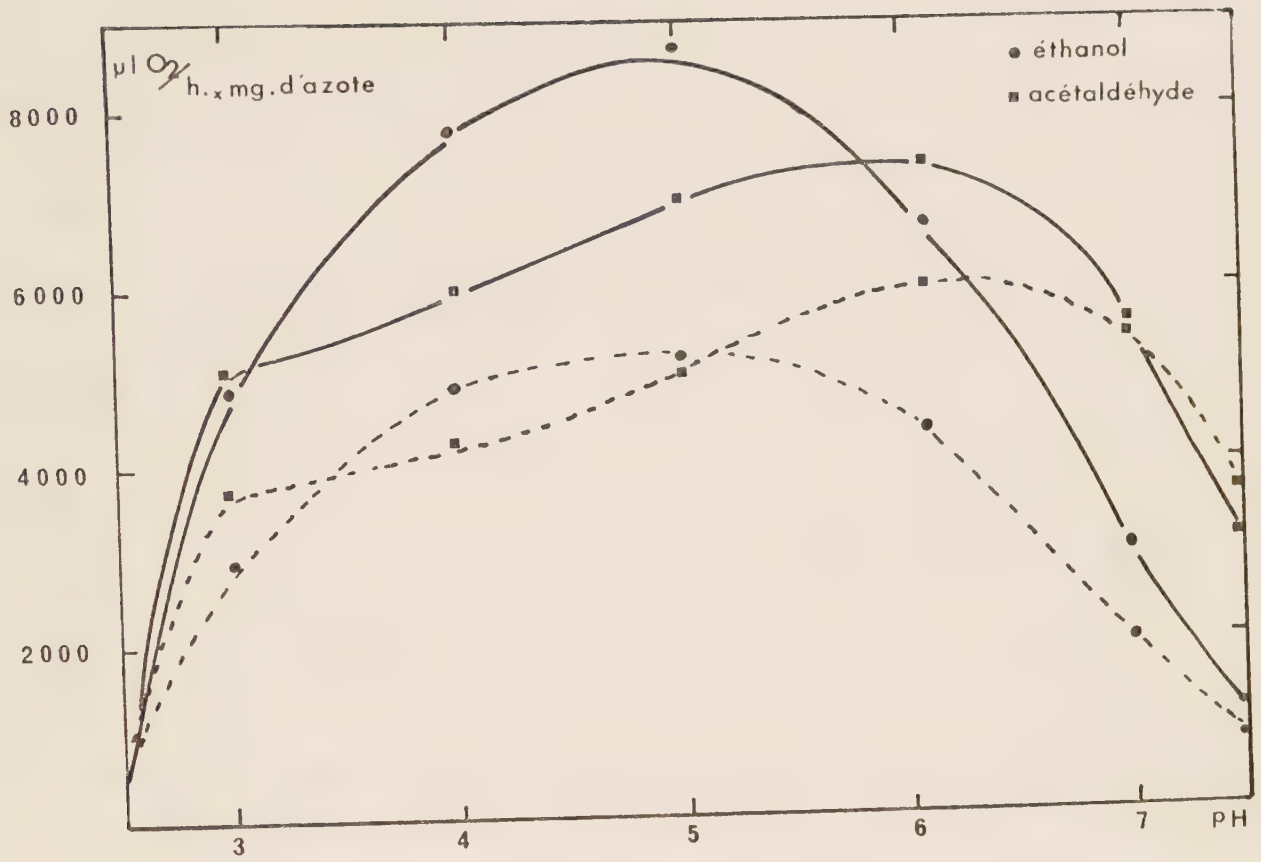

Fig. 19 : Vitesse d'oxydation de l'éthanol et l'acétaldéhyde par les extraits particulaires d'A. rancens.

——— extraits particulaires de bactéries cultivées avec l'éthanol comme substrat carboné

- - - - - extraits particulaires de bactéries cultivées avec le lactate comme substrat carboné.

- L'échange gazeux est mesuré par la technique de WARBURG.
- La température de l'expérience est de 30°C pour l'éthanol et de 28°C pour l'acétaldéhyde, la concentration des substrats est de 0,05 M.

Les autres conditions expérimentales sont notées dans le chapitre Matériel et Méthodes.

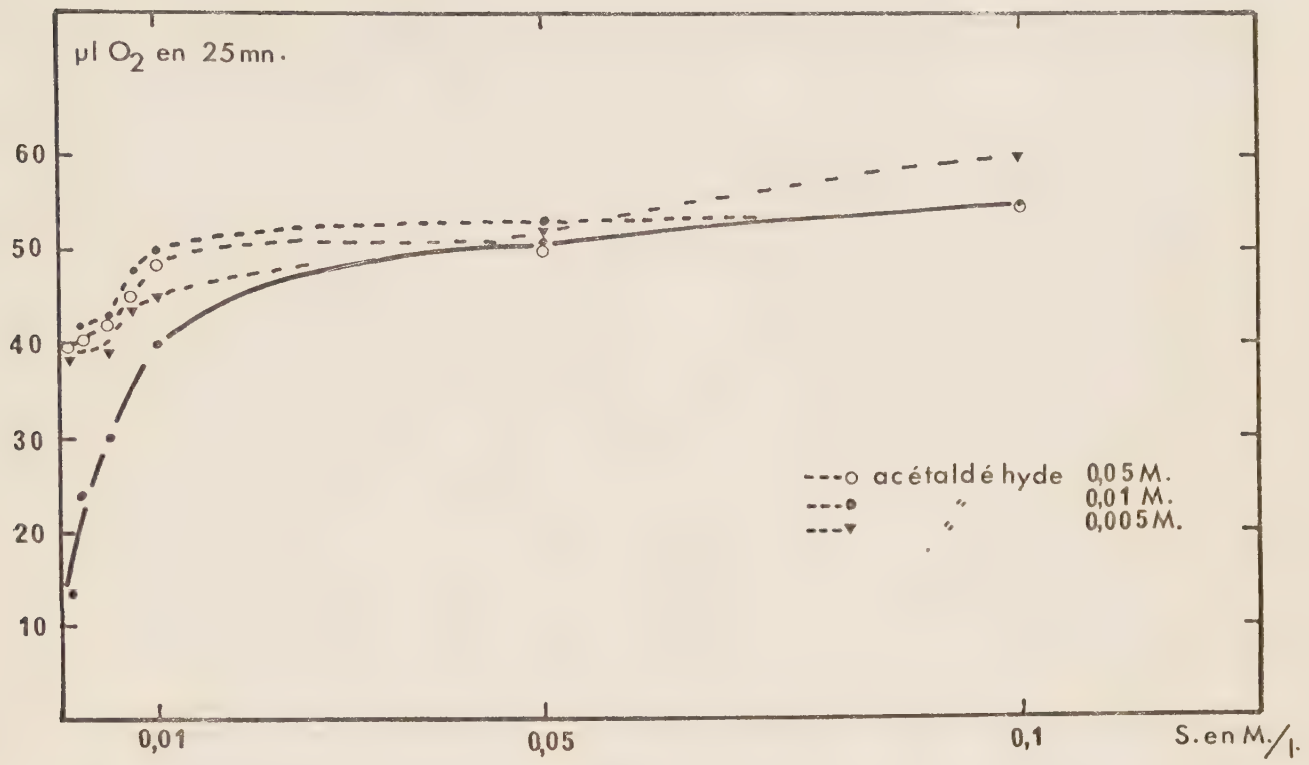

Fig. 20 : Cinétique d'oxydation de l'éthanol par les extraits particulaires d'A. rancens en présence de différentes concentration d'acétaldélyde.

L'échange gazeux est mesuré par la technique de WARBURG à la température de 28°C. Le pH de l'expérience est de 5.

L'extrait particulaire correspond à 0,085 mg d'azote par fioles.

S représente la concentration en éthanol.

Les autres conditions expérimentales sont notées dans le chapitre Matériel et Méthodes.

de l'acétaldéhyde, nous avons été amenés à étudier le fonctionnement des enzymes particulaires au cours de l'oxydation de l'éthanol.

Fonctionnement des enzymes particulaires au cours de l'oxydation de l'éthanol.

L'oxydation de l'éthanol uniformément marqué est suivie par la méthode manométrique de WARBURG à pH 6 de manière à pouvoir mesurer la consommation d'oxygène. En opérant en présence de différentes quantités d'acétaldéhyde, on peut imputer la consommation d'oxygène aux déshydrogénases mises en cause (DIVIES et DUPUY, 1970, b). Il suffit pour cela de mesurer la quantité d'éthanol restant et les produits de sa transformation. L'arrêt de la réaction est provoqué par addition d'acide trichloracétique. Après alcalinisation, l'éthanol et l'acétaldéhyde sont séparés de l'acétate par distillation et recueillis dans une solution saturée de dimédon. La réaction de formation de l'éthylène bisméthone insoluble se fait durant trois jours à la température du laboratoire (SIGGIA, 1962). Puis l'éthanol est à nouveau séparé par distillation. L'acétate et l'éthylène bisméthone sont évaporés à sec à 95°C, puis repris respectivement dans 1 ml d'eau distillée et 1 ml d'éthanol.

Les comptages d'acétate, d'éthylène bismétone et d'éthanol ont été effectués par scintillation (appareil Tricarb de Packard). Le liquide scintillant utilisé a la composition suivante : 10 ml de toluène, 50 mg de PPO (1), 3 mg de diméthyl POPOP (2), 9 ml d'éthanol, ce qui permet d'introduire 1 ml de solution aqueuse dans 20 ml de liquide scintillant.

(1) PPO : 2-5-diphényloxazole.
(2) Dimethyl POPOP : 1,4-bis-2(4-méthyl-5-phényloxazolyl)-benzène.

Les données du tableau IV indiquent que l'acétaldéhyde marqué s'accumule dans le milieu de réaction et qu'il est dilué avec l'acétaldéhyde non radioactif, puisque l'accumulation passe de 4 250 d. p. m. à 28 400 lorsque la concentration d'acétaldéhyde devient égale à 75 mM/l.

A partir des mesures de radioactivité et d'oxygène consommé, on peut déterminer l'activité de l'alcool et de l'aldéhyde déshydrogénase (fig. 21).

On constate qu'une molécule vraie radioactive d'éthanol marquée sur le carbone conserve sa radioactivité au cours de la transformation en aldéhyde et en acétate puisqu'il n'y a pas de perte d'atome de carbone.

Le calcul des activités des alcool et acétaldéhyde déshydrogénase peut s'effectuer de deux manières. Selon que l'on tienne compte pour le calcul d'activité de la radioactivité récupérée sous forme d'éthanol ou de la radioactivité récupérée sous forme d'acétaldéhyde et d'acétate.

Dans la colonne 1 du tableau IV par exemple on a utilisé pour l'expérience 416 000 d. p. m. correspondant à 8 x 2 = 16 µmoles d'éthanol. Une µmole d'éthanol, d'aldéhyde ou d'acétate qui en dérive correspond à $\frac{416\ 000}{16}$ = 26 000 d. p. m.

A la fin de l'expérience on peut estimer que le nombre de molécules d'éthanol transformées par l'éthanol déshydrogénase sera égale à $\frac{416\ 000}{26\ 000}$ = 7,57 µmoles et en 60 mn $\frac{7,57}{57}$ x 60 = 7,97 µmoles.

Si l'on tient compte de l'acétaldéhyde et de l'acétate récupérés on aura à la fin de l'expérience le

TABLEAU IV

Bilan des produits accumulés au cours de l'oxydation de l'éthanol marqué par les particules submicroscopiques d'Acetobacter rancens.

			1	2	3	4
	Concentration par fioles en mM/l	Ethanol...	8	8	8	8
		Ethanal...	0	2,5	25	75
	Radioactivité introduite sous forme d'éthanol en d.p.m.....		416 000	416 000	416 000	416 000
	Radioactivité récupérée en fin de réaction en d.p.m. après	Ethanol...	219 000	264 000	304 000	322 000
		Ethanal...	4 250	7 700	24 600	28 400
		Acétate...	144 000	70 000	28 600	14 100
			57 mn	39 mn	57 mn	57 mn
	Radioactivité récupérée en pour cent de la radioactivité introduite.....		87	82	87	85
	µmoles de O_2 consommées par heure....		5,63	6,55	6,64	6,32
Méthode 1	Activité de l'alcool déshydrogénase en µmoles de substrat transformé par heure.....		7,97	9,0	4,52	3,80
	Activité de l'aldéhyde déshydrogénase		3,28	4,1	8,76	8,84
Méthode 2	Activité de l'alcool déshydrogénase en µmoles de substrat transformé par heure.....		6,00	4,60	2,15	1,72
	Activité de l'aldéhyde déshydrogénase		5,26	8,50	11,15	10,92

Chaque fiole de Warburg contient : tampon phosphate 0,1 M,pH=6 ; particules correspondant à 0,15 mg d'N par fiole ; volume total 2 ml; température 28°C.

Les méthodes de calcul des activités enzymatiques sont expliquées dans le texte.

Fig. 21 : Schéma des réactions catalysées par les particules (La partie hachurée représente la fraction radioactive des produits)

nombre de molécules d'éthanol transformées qui sera égal à $\frac{4250}{26000} + \frac{144000}{26000} = 5,7$ µ moles et en 60 mn $\frac{5,7 \times 60}{57} = 6$ µ moles

Dans les deux cas pour connaître l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase selon la fig. 21 on écrira que :

$$\text{Activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase} = \left(\begin{matrix}\mu \text{ moles d'}O_2 \\ \text{consommées}\end{matrix} - \frac{\mu \text{ moles d'éthanol transformées}}{2}\right) \times 2$$

Les résultats de ces calculs par les deux méthodes donnent des chiffres différents, car la récupération de l'éthanol, de l'acétaldéhyde et de l'acétate ne s'effectue pas vraisemblablement avec le même rendement.

Les conclusions que l'on peut tirer sont toutefois similaires, le fonctionnement de l'éthanol déshydrogénase est inhibé par les concentrations croissantes d'acétaldéhyde. On a vérifié que le système acétaldéhyde déshydrogénase était saturé par une concentration d'acétaldéhyde de 8 mM/l.

L'acétaldéhyde est un métabolite intermédiaire facilement libéré dans le milieu par les particules submicroscopiques d'*Acetobacter rancens*, d'autre part l'acétaldéhyde libre produit une inhibition de l'alcool déshydrogénase et sature le système aldéhyde déshydrogénase qui fonctionne plus rapidement. L'acétaldéhyde est donc un intermédiaire obligatoire pour le système insoluble d'oxydation de l'éthanol comme il l'est pour le système soluble.

II - Cinétique d'oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde par A. mesoxydans (DIVIES, 1972, a)

Nous avons observé au chapitre précédent que la production d'acide acétique se ralentit au fur et à mesure que l'acide acétique s'accumule dans le milieu ; en culture continue, à l'état d'équilibre, s'il n'y a pas de facteurs nutritifs limitants, on observe que la concentration d'acide acétique du milieu P est relié au coefficient de dilution D par une équation du type $P = \frac{a - D}{b}$, a et b sont deux constantes fonction du total T représentant la somme de la concentration en éthanol et de la concentration en acide acétique.

Nous savons que l'oxydation de l'éthanol est effectuée chez les bactéries acétiques par deux types d'enzymes différentes : enzymes particulaires et enzymes solubles (DUPUY et MAUGENET, 1962) et qu'il faut considérer l'oxydation de l'éthanol par les enzymes particulaires comme la succession de deux réactions catalysées par une éthanol déshydrogénase et une acétaldéhyde-déshydrogénase. C'est pourquoi, nous avons comparé la cinétique d'oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde des cellules entières et des enzymes particulaires en l'absence et en présence d'acide acétique. Enfin, il est courant d'observer au cours des arrêts de production, par manque d'oxygène, une forte odeur d'acétaldéhyde ; nous avons donc mesuré le Km (O_2) pour les deux substrats.

La respiration des cellules ainsi que les mesures d'activités des éthanol et acétaldéhyde déshydrogénases particulaires ont été effectuées selon la méthode manométrique de WARBURG, à 25°C en ce qui concerne l'acétaldéhyde, et à 30°C pour l'éthanol. Pour toutes nos expériences nous avons choisi d'utiliser le tampon phosphate 0,2 M dont le pH est déterminé par mélange d'H_3PO_4, NaH_2PO_4, Na_2HPO_4. Dans

certaines zones de pH les mélanges de phosphate utilisés n'ont pas de bon pouvoir tampon, aussi nous avons vérifié que le pH restait bien constant au cours des mesures. Les solutions d'acide acétique utilisées ont été portées préalablement au pH de l'expérience. Afin qu'il ne subsiste aucune ambiguité au cours de la lecture du texte, nous précisons que nous nommons acide acétique la somme de la forme dissociée et non dissociée de l'acide acétique ; le terme acétate est réservé à l'ion $CH_3\text{-}COO^-$. La préparation de l'atmosphère des manomètres pour la mesure des Km (O_2) a été faite en faisant circuler 2 litres de gaz contenant différentes teneurs d'oxygène et d'azote.

1° - *Oxydation de l'éthanol*

a) *Cellules non proliférantes*

Nous constatons (fig. 22) une cinétique différente dans l'oxydation de l'éthanol pour les intervalles de concentrations $0{,}425.10^{-3}$M à $42{,}5.10^{-3}$M et 122.10^{-3}M à 820.10^{-3}M.

Les constantes apparentes mesurées graphiquement sont respectivement de $3{,}5.10^{-3}$M et $3{,}8.10^{-2}$M.

Les mesures effectuées entre les pH 2,5 et 7,5, pour des concentrations d'éthanol prises dans les deux intervalles présentant une cinétique différente, ne nous ont pas permis de montrer l'existence de pH optimum différent pour les concentrations considérées.

b) *Enzymes particulaires*

On observe (fig. 23) deux cinétiques différentes dans l'oxydation de l'éthanol. A pH 3,7, pour les intervalles de concentration $2{,}12.10^{-3}$M à $21{,}2.10^{-3}$M et $42{,}5.10^{-3}$M à 365.10^{-3}M les constantes apparentes sont respectivement : $Km_1 = 2{,}5.10^{-3}$M et $Km_2 = 2{,}5.10^{-2}$M.

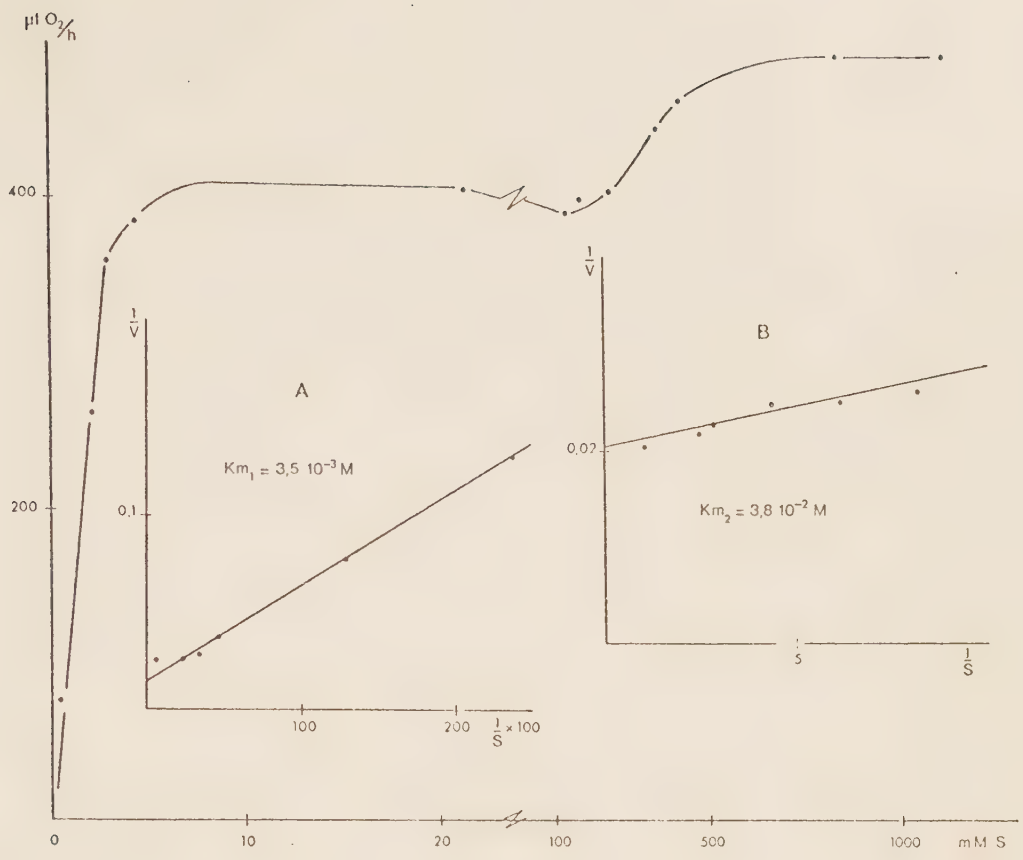

Fig. 22 : Vitesse d'oxydation de l'éthanol en fonction de la concentration par les cellules non proliférantes d'A. mesoxydans.

Respiration mesurée par la technique de Warburg. Atmosphère : air. Température 30°C. Mélange réactionnel : bactéries 0,5 ml à la concentration de 0,386 mg/ml ; Ethanol (S) 0,5 ml à différentes concentrations ; Tampon phosphate 0,2 M, pH=3,2 1ml.

A l'intérieur : A : représentation des données de la figure 22 selon LINEWEAVER et BURK pour les concentrations de l'éthanol (S) allant de $0,425 \cdot 10^{-3}$M à $42,5 \cdot 10^{-3}$M.

B : représentation des données de la figure 22 selon LINEWEAVER et BURK pour les concentrations de l'éthanol (S) allant de $122 \cdot 10^{-3}$M à $820 \cdot 10^{-3}$M.

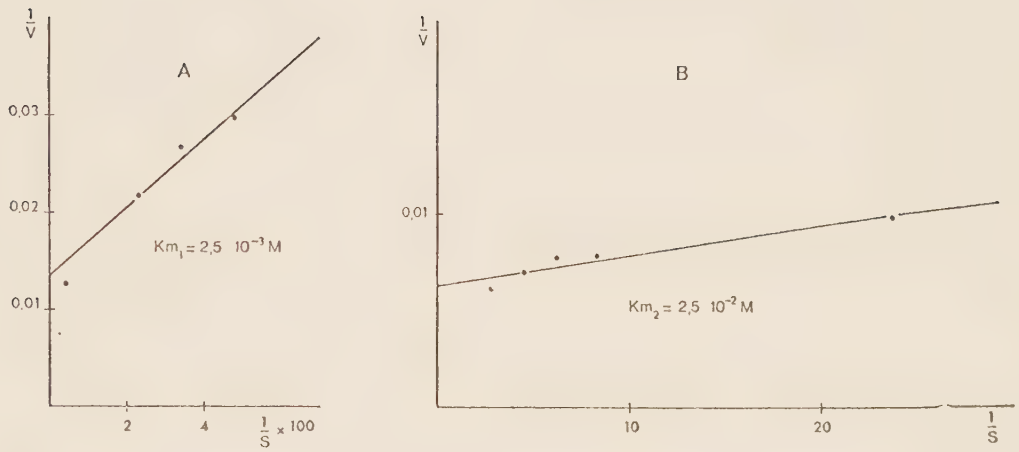

Fig. 23 : Influence de la concentration en éthanol sur la vitesse de la réaction réalisée par les particules d'A. mesoxydans.

A : Mêmes conditions expérimentales que pour l'expérience de la figure 22. Les bactéries sont remplacées par les enzymes particulaires. La concentration en éthanol varie de $2,12.10^{-3}$M à $21,2.10^{-3}$M.

B : Mêmes conditions expérimentales que pour l'expérience de la figure 22. Les bactéries sont remplacées par les enzymes particulaires. La concentration en éthanol varie de $42,5.10^{-3}$M à 365.10^{3}M.

De même que pour les cellules entières, les mesures de la vitesse d'oxydation de l'éthanol en fonction du pH ne montrent pas de pH optimum différent pour les différentes concentrations d'éthanol considérées.

2° - *Oxydation de l'acétaldéhyde*

De même que pour l'oxydation de l'éthanol, on observe pour l'oxydation de l'acétaldéhyde par les enzymes particulaires (fig. 24) deux cinétiques différentes suivant la concentration $Km_1 = 9.10^{-5}$M et $Km_2 = 1,8.10^{-3}$M. Pour les fortes concentrations d'acétaldéhyde (fig. 25) supérieures à 10 mM/l, nous constatons une inhibition par le substrat, Ki = 0,203 M.

3° - *Action de l'acide acétique sur l'oxydation de l'éthanol*

a) *Enzymes particulaires*

Puisque l'on observe deux constantes apparentes pour l'oxydation de l'éthanol, nous avons été amenés à mesurer l'action de l'acide acétique pour les deux constantes. En adoptant la représentation de l'inverse de la vitesse d'oxydation du substrat en fonction de la concentration de l'inhibiteur pour différentes valeurs de la concentration en substrat, nous constatons pour l'expérience rapportée (fig. 26, a, b) que l'acide acétique est un inhibiteur compétitif, les constantes d'inhibition sont du même ordre de grandeur Ki = 0,15 M et Ki = 0,2 M et pour les intervalles étudiés, les constantes apparentes pour l'éthanol au pH de mesure de 5 sont de $Km_1 = 4,1.10^{-3}$M et $Km_2 = 3,32.10^{-2}$M.

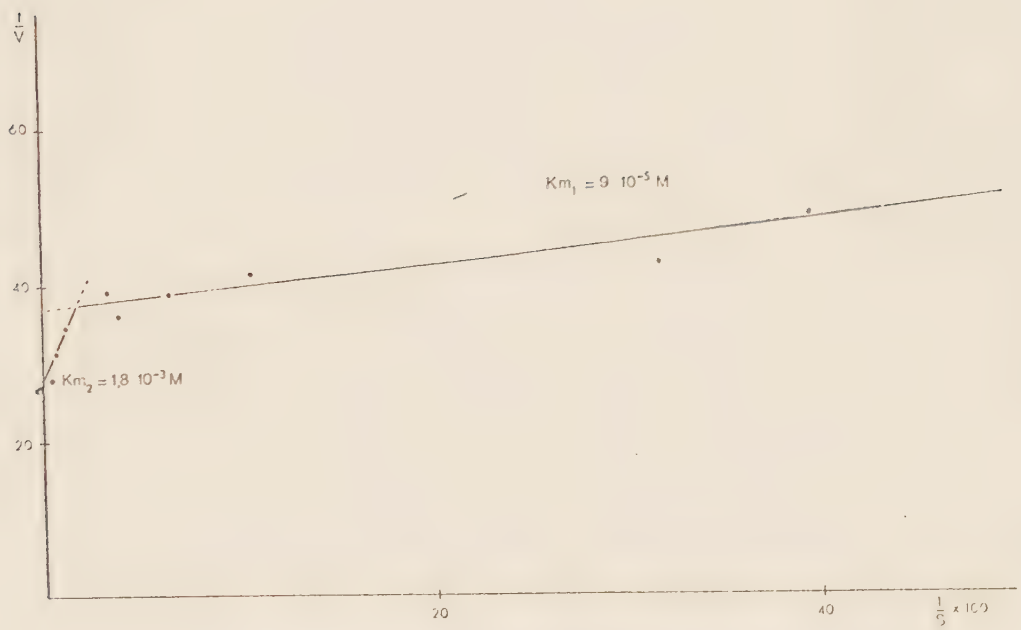

Fig. 24 : *Influence de la concentration en acétaldéhyde sur la vitesse de la réaction réalisée par les particules d'A. mesoxydans.*

Mélange réactionnel : Enzyme particulaire dans tampon phosphate 0,01 M, pH=6,5, 0,3 ml ; Tampon phosphate 0,04 M, pH=6,5, 3 ml ; Ferricyanure de potassium 0,02 M, 0,2 ml ; Acétaldéhyde à différentes concentrations 0,1 ml. La vitesse V = Δ DO 400 nm/mn. Température 25°C.

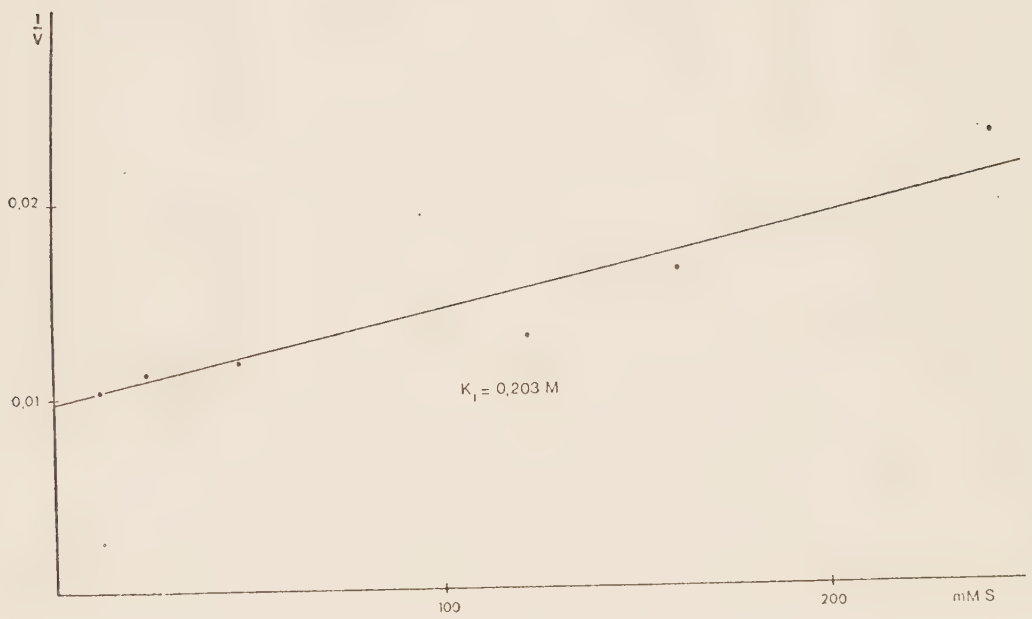

Fig. 25 : Mesure de l'inhibition provoquée par des fortes concentrations d'acétaldéhyde sur sa propre oxydation réalisée par les enzymes particulaires.

Mêmes conditions expérimentales que pour l'expérience de la figure 22. Température 25°C.

S représente la concentration d'acétaldéhyde, V la vitesse d'oxydation de l'acétaldéhyde exprimée en µl O_2 consommés pendant 5 mn.

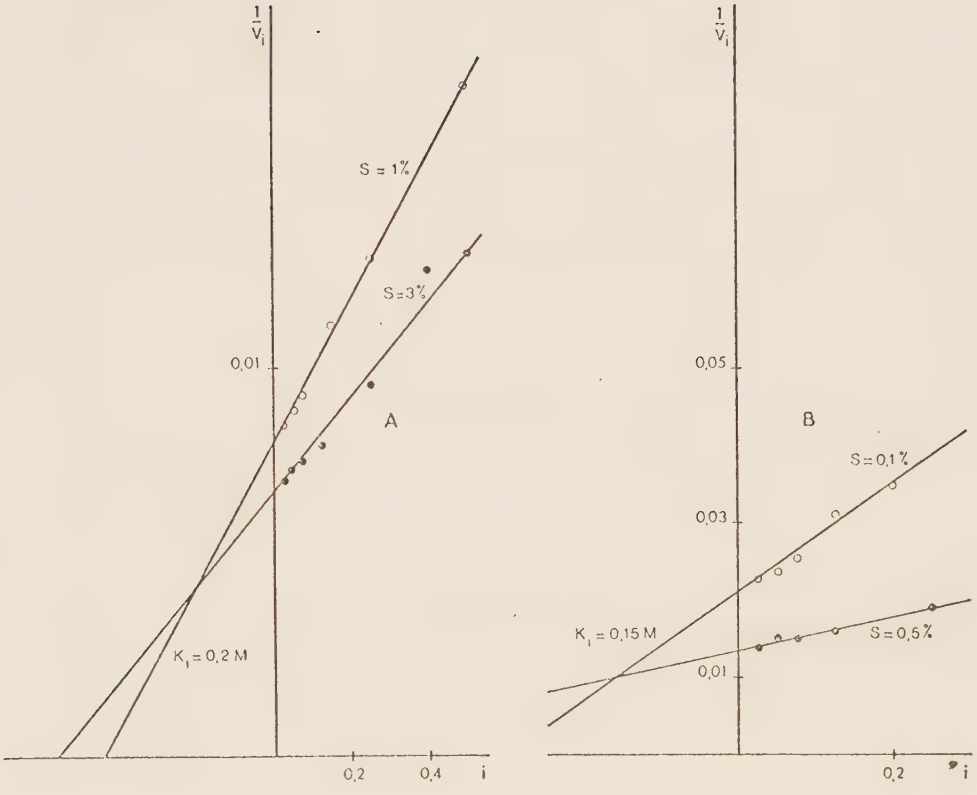

Fig. 26 : Inhibition par l'acide acétique de l'oxydation par les enzymes particulaires de fortes concentrations d'éthanol.

A : Mêmes conditions expérimentales que pour l'expérience de la figure 22.
Mélange réactionnel : 0,4 ml d'enzymes particulaires ; 0,5 ml d'éthanol 1 p. 100 ou 3 p. 100 ; 0,5 ml d'acétate de sodium, pH = 5 à différentes concentrations ; 0,6 ml de tampon phosphate 0,2 M, pH = 5.
i représente la concentration en acide acétique,
s représente la concentration en éthanol,
Vi, la vitesse d'oxydation de l'éthanol en présence d'acétate exprimée en µl O_2 consommés pendant 20 mn.
B : Conditions expérimentales identiques à celles de la figure 26 A. Seules les concentrations d'éthanol ont été changées.
Vi, représente la vitesse d'oxydation de l'éthanol en présence d'acétate exprimée en µl O_2 consommés pendant 35 mn.
Le mélange réactionnel contient 0,6 ml d'enzymes particulaires

Ces constantes Km_1 et Km_2 sont calculées à partir de l'équation générale (AIBA et al, 1965) :

$$\frac{1}{v} = \frac{Km}{V} \left(1 + \frac{i}{Ki}\right) \frac{1}{S} + \frac{1}{V}$$

Dans cette équation, v représente la vitesse d'oxydation de l'éthanol en présence d'acide acétique, V la vitesse maximale de la réaction, i la concentration d'acide acétique, et S la concentration d'éthanol.

On peut encore écrire :

$$v = \frac{VS}{Km + S + \frac{Km}{Ki} i}$$

Pour les mêmes concentrations d'éthanol, on observe qu'à pH = 5, Ki = 0,2 M et à pH = 3,6, Ki = $4{,}5.10^{-2}$M.

Lorsque le pH diminue, pour une même quantité d'acide acétique introduite, on observe donc que l'inhibition augmente. L'acide acétique non dissocié est-il responsable de cette inhibition ?

Si l'acide acétique non dissocié est l'inhibiteur responsable, on doit avoir quel que soit le pH :

$$v = \frac{VS}{Km + S + \frac{Km}{Kr} (AH)}$$

(AH) représentant la concentration de la forme non dissociée de l'acide acétique et Kr la constante réelle d'inhibition.

Posons $i = (A^-) + (AH)$, (A^-) représentant la concentration de la forme dissociée de l'acide acétique.

A un pH déterminé, $v = \frac{VS}{Km + S + \frac{Km}{Ki}\ (\ (A^-)+(AH)\ )}$

d'où $\frac{(AH)}{Kr} = \frac{(A^-) + (AH)}{Ki}$ et $Kr = \frac{(AH)\ \ Ki}{(A^-) + (AH)}$

Soit la constante de dissociation de l'acide acétique. $Ka = \frac{(A^-)\ (H^+)}{(AH)}$, on peut encore écrire $Kr = \frac{(H^+)\ \ Ki}{(H^+) + Ka}$

Tenant compte de ces transformations, on obtient en choisissant $Ka = 1{,}4.10^{-5}M$ (TRUCHET, 1948) : à pH = 3,6 $Kr = 4{,}25.10^{-2}M$ et à pH = 5, $Kr = 8{,}35.10^{-2}M$.

Nous observons enfin (fig. 27, courbes 1 et 2) la similitude entre le pourcentage d'acide acétique non dissocié et le pourcentage d'inhibition.

Le rapport des vitesses d'oxydation de l'éthanol en absence et en présence d'acide acétique en fonction de la teneur en acide acétique non dissocié et selon le pH de la réaction est représenté dans la fig. 28. Nous constatons que l'acide acétique non dissocié se comporte aussi comme inhibiteur compétitif vis-à-vis des ions H^+ ; rappelons que DUPUY (1958, a) avait montré que les ions H^+ étaient des inhibiteurs compétitif vis-à-vis de l'éthanol.

b) *Cellules non proliférantes*

Les mesures effectuées sur les cellules entières montrent de même que l'acide acétique est un inhibiteur compétitif pour l'oxydation de l'éthanol ; cependant à pH = 3,6, une concentration de 0,025 M entraîne une inhibition de 6 p. 100 alors que sur les enzymes particulaires, cette inhibition est de 26,5 p. 100. Le Ki passe de $4{,}5.10^{-2}M$ à $2.10^{-1}M$. De plus, en portant en fonction du pH le pourcentage d'inhibition pour une même quantité d'acide acétique introduite, nous observons à la différence des enzymes particulaires une inhibition minimale à pH = 6 (fig. 27, courbe 4).

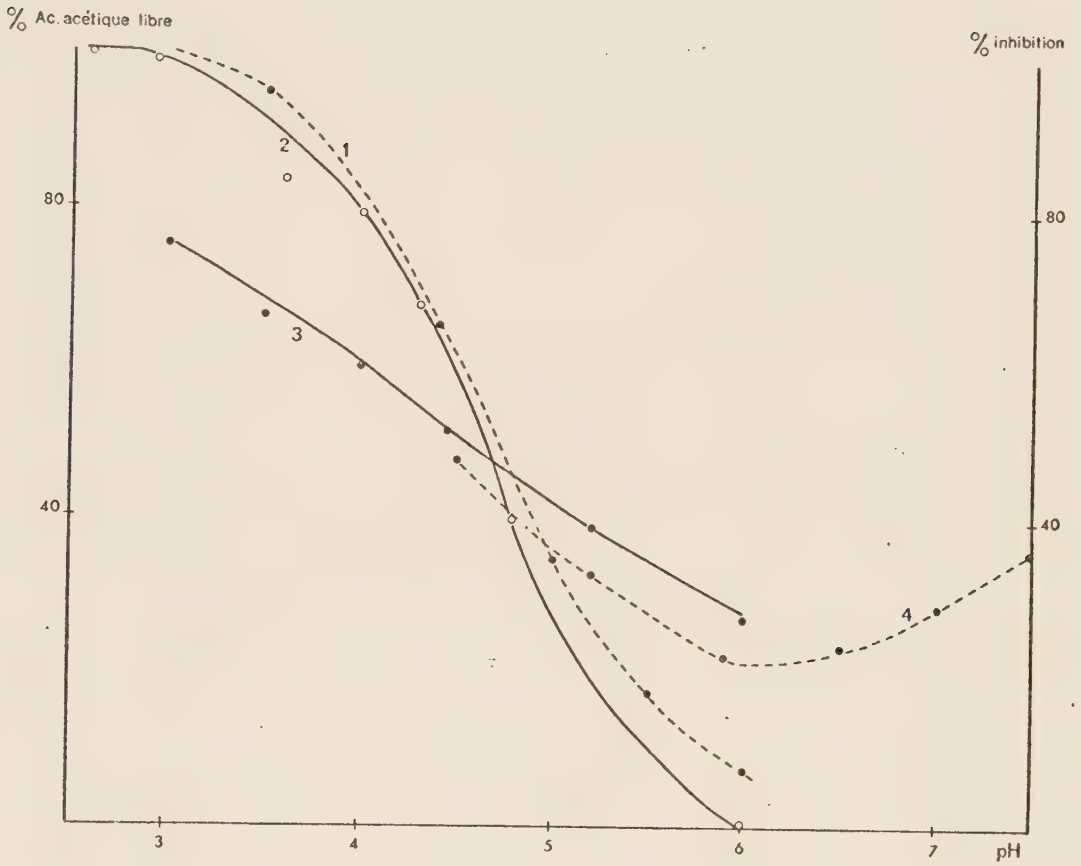

Fig. 27 : Inhibition de l'oxydation de l'éthanol en fonction du pH pour une même concentration d'acide acétique.

Courbe 1 : pourcentage d'acide acétique non dissocié,
Courbe 2 : pourcentage de l'inhibition de l'oxydation par les enzymes particulaires.

La concentration d'éthanol à chaque pH est de $42,5.10^{-3}$M et la concentration d'acide acétique est de 0,75 M.

Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la figure 26 a.

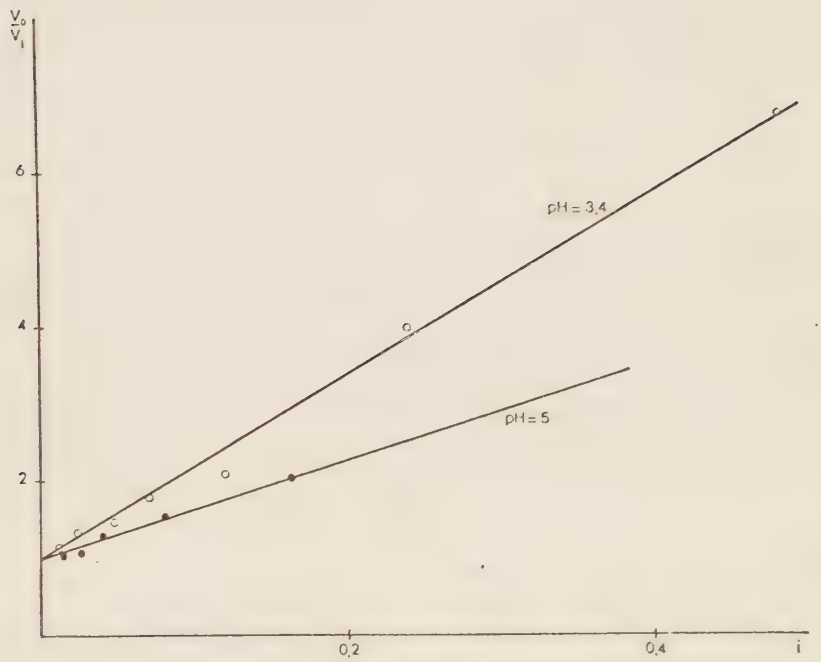

Fig. 28 : Inhibition par l'acide acétique non dissocié de l'oxydation de l'éthanol par les enzymes particulaires.

Vo : vitesse d'oxydation sans inhibition,
Vi : vitesse d'oxydation en présence d'acide acétique,
i : représente la concentration en acide acétique non dissocié.

Les pH de la réaction sont de 3,4 et 5.

Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour l'expérience de la figure 26 a.

4° - *Action de l'acide acétique sur l'oxydation de l'acétaldéhyde*

L'action de l'acide acétique est moins prononcée sur l'acétaldéhyde-déshydrogénase particulaire que sur l'éthanol-déshydrogénase particulaire ; ainsi, à pH = 3,6, 0,75 M d'acide acétique entraîne une inhibition de 57 p. 100, alors que cette inhibition est de 86 p. 100 sur l'éthanol-déshydrogénase particulaire. L'inhibition observée est indépendante de la concentration d'acétaldéhyde ; il ne s'agit donc pas d'une inhibition de type compétitif comme pour l'éthanol.

5° - *Action de la teneur en oxygène sur l'oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde*

Les mesures effectuées sur les enzymes particulaires à pH = 3,5 par la méthode manométrique de WARBURG ont donné pour l'éthanol Km (O_2) = $15,6.10^{-6}$M et pour l'acétaldéhyde $83,5.10^{-6}$M.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'observation sur les cellules entières de deux constantes enzymatiques différentes dans l'oxydation de l'éthanol et le fait que l'on retrouve des valeurs sensiblement égales pour les enzymes particulaires montrent bien que ce sont ces dernières qui sont responsables du phénomène observé.

La première constante est de l'ordre de grandeur de l'éthanol-déshydrogénase particulaire décrite par NAKAYAMA (1961, a, b). Cet auteur en utilisant le ferricyanure comme accepteur d'électrons trouve un Km = $2,8.10^{-3}$M au pH de mesure de 3,8. Nous notons que l'une des constantes

apparentes sur les cellules entières est de $3,5.10^{-3}$M et sur les enzymes particulaires de $2,5.10^{-3}$M. La seconde constante de $3,9.10^{-2}$M sur les cellules entières n'a jamais été signalée à notre connaissance.

L'acide acétique ne change pas la valeur de ces constantes, puisqu'en étudiant son inhibition on retrouve les mêmes valeurs. Pour expliquer ce phéonmène, on peut formuler deux hypothèses :

a - les activités mesurées représentant la somme de deux déshydrogénases particulaires dont les constantes apparentes sont différentes ;

b - l'éthanol-déshydrogénase fixée sur la membrane des bactéries peut être assimilée au cas étudié par SELEGNY et al (1969). Ces auteurs ont pu montrer à l'aide de membranes artificielles que, dans le cas où l'enzyme est présente simultanément en surface et à l'intérieur de la membrane, on peut obtenir des variations de l'activité présentant deux ou plusieurs paliers.

Ces deux hypothèses conviennent aussi pour la cinétique observée dans l'oxydation de l'acétaldéhyde.

Pour pouvoir choisir entre ces deux hypothèses, il faut entreprendre d'autres recherches, notamment isoler l'enzyme ou les deux enzymes responsables.

Lorsque par coupure de l'aération on arrête brusquement la production d'acide acétique, il est courant de constater une accumulation d'acétaldéhyde dans le milieu de culture. Ce fait est confirmé par les mesures du Km (O_2) pour l'éthanol et l'acétaldéhyde. Lorsque le milieu s'appauvrit en O_2, la réaction acétaldéhyde-acide acétique est arrêtée avant la réaction éthanol-acétaldéhyde, puisque le Km O_2 pour l'acétaldéhyde est de $83,5.10^{-6}$M au lieu de $15,6.10^{-6}$M pour l'éthanol.

Les mesures sur les cellules non proliférantes et sur les extraits enzymatiques montrent que l'acide acétique est un inhibiteur compétitif vis-à-vis de l'éthanol et non vis-à-vis de l'acétaldéhyde. DUPUY (1958, a) a montré que les ions (H^+) sont des inhibiteurs compétitifs dans l'oxydation de l'éthanol ; nous constatons que les ions (H^+) entrent aussi en compétition avec l'acide acétique non dissocié pour l'inhibition dans l'oxydation de l'éthanol. MORI, KONNO, TERUI (1970) constatent que l'acide acétique augmente le Km (O_2) qui passe de 7.10^{-7}M à $2,64.10^{-5}$M à pH = 3,8 et de $7,2.10^{-7}$M à $1,95.10^{-6}$M à pH = 5,8. A pH = 3,8 pour une même concentration d'acide acétique, l'inhibition est plus forte. Est-ce ici aussi la forme non dissociée de l'acide acétique qui participe à cette inhibition ?

L'acide acétique paraît donc intervenir à différents niveaux dans l'oxydation de l'éthanol. Il entre en compétition avec les ions (H^+), l'éthanol et avec l'oxygène.

A la différence des constantes de MICHAELIS obtenues pour l'éthanol qui sont sensiblement égales sur les cellules entières et sur les enzymes particulaires, les constantes d'inhibition de l'acide acétique passent à pH = 3,6 de $4,5.10^{-2}$M pour les extraits cellulaires à 0,2 M pour les cellules non proliférantes.

On peut de même considérer que les mesures effectuées sur les cellules entières ne sont pas transposables aux cellules en croissance réalisant la production d'acide acétique.

Nous avons vu au chapitre précédent qu'au pH de croissance 2,8 pour des doses d'acide acétique voisines de la normalité les cellules continuent d'oxyder

l'éthanol alors que dans ces mêmes conditions, pour des cellules non proliférantes, l'oxydation de l'éthanol est complètement inhibée.

III - Action du substrat carboné sur l'oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde par A. aceti (DIVIES, 1970 C)

Nous avons déjà vu que les intensités relatives des activités éthanol et acétaldéhyde-déshydrogénase particulaires varient chez A. *rancens* selon la source principale de carbone utilisée. Cette souche présente l'inconvénient de requérir de l'extrait de levure pour sa croissance sur éthanol comme source principale de carbone. C'est pourquoi il nous a paru plus judicieux de voir avec A. *aceti*, qui présente l'avantage de se développer sur un milieu parfaitement défini, dans quelle mesure sa constitution enzymatique pouvait varier. Les milieux de culture utilisés sont décrits dans le chapitre Matériel et Méthodes.

1° - Oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde par les cellules entières

a) Oxydation de l'éthanol

Nous constatons (tabl. V) que les cellules cultivées sur éthanol présentent une activité d'oxydation de l'éthanol plus importante que les cellules ayant poussé sur acétate, lactate et glucose-alanine. Cette activité constante de pH = 5 à 7,7 pour les cellules cultivées sur éthanol présente un maximum plus accentué à pH = 5,5 - 6,0 pour les cellules obtenues à partir des autres substrats.

b) Oxydation de l'acétaldéhyde

On observe (tabl. VI) une activité d'oxydation de l'acétaldéhyde beaucoup plus élevée que pour l'éthanol

TABLEAU V

*Activité d'oxydation de l'éthanol pour les cellules entières d'*Acetobacter aceti *après leur croissance sur différents substrats carbonés*

Q_{O_2} des cellules entières provenant de culture sur :	pH de mesure						
	3,5	4,0	5,0	5,5	6,0	7,0	7,7
Éthanol	230	416	884	876	850	784	810
Acétate	113	250	565	588	541	357	112
Lactate	128	276	456	466	571	374	289
Glucose-alanine ...	102	117	306	319	306	262	189

Les mesures de Q O_2 ont été exprimées en µl O_2/heure et par mg de poids sec. Éthanol à la concentration de $5 \cdot 10^{-2}$ M. Tampon tartrate-phosphate 0,1 M de pH = 4 à 7. Tampon phosphate 0,1 M à pH = 3,5 et 7,7. 0,2 ml de KOH à 20 p. 100 dans la cupule centrale.

TABLEAU VI

*Activité d'oxydation de l'acétaldéhyde pour les cellules entières d'*A. aceti *après leur croissance sur différents substrats carbonés*

Q_{O_2} des cellules entières provenant de culture sur :	pH de mesure						
	3,5	4,0	5,0	5,5	6,0	7,0	7,7
Éthanol	1 770	2 345	2 465	2 560	2 560	2 670	2 580
Acétate	1 074	1 575	1 717	1 690	1 770	1 735	1 690
Lactate	1 615	1 410	1 615	1 770	1 970	2 006	2 600
Glucose-alanine ...	731	940	987	1 030	1 070	1 050	946

Acétaldéhyde à la concentration de 5.10^{-2}M. Mêmes conditions expérimentales que pour l'expérience du tableau V.

(tabl. V). Nous avons constaté pour A. *rancens*, par exemple, que le QO_2 pour l'éthanol et l'acétaldéhyde étaient voisins. Nous constatons aussi, pour tous les types de cellules, que l'activité d'oxydation de l'acétaldéhyde est sensiblement constante de pH = 5,0 à 7,7. Entre les différents types de cellules on observe des différences dans l'oxydation de l'acétaldéhyde.

2° - *Oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde par l'extrait insoluble*

a) *Ethanol-déshydrogénase insoluble*

A la différence de ce que montrent les cellules entières (tabl. V), on obtient pour les extraits acellulaires (tabl. VII) une plus forte différence d'activité suivant le substrat carboné de la culture. A pH = 5,0 cette diminution est supérieure à 83 p. 100 pour les extraits obtenus à partir d'acétate, de lactate ou de glucose-alanine par rapport aux extraits obtenus à partir d'éthanol.

b) *Aldéhyde-déshydrogénase insoluble*

L'aldéhyde-déshydrogénase insoluble (tabl. VIII) présente un pH optimum de 6,0 alors que celui pour l'éthanol-déshydrogénase insoluble est de 5,0. Enfin, l'activité des extraits cellulaires obtenus à partir d'acétate, lactate et glucose-alanine est voisine de 50 p. 100 de l'activité des extraits obtenus à partir d'éthanol.

3° - *Ethanol et acétaldéhyde-déshydrogénase solubles (tabl. IX)*

Les mesures que nous avons effectuées sur les extraits enzymatiques nous ont montré que la souche d'A. *aceti* étudiée possédait une activité éthanol-déshydrogénase liée au NAD ; la faible activité liée au NADP que nous avons portée dans le tableau IX est sensiblement constante pour les quatre extraits enzymatiques.

TABLEAU VII

Activité d'oxydation de l'éthanol pour l'éthanol déshydrogénase insoluble des cellules après leur croissance sur différents substrats carbonés

Q_{O_2} de l'éthanol déshydrogénase obtenu après culture sur :	pH de mesure						
	3,5	4,0	5,0	5,5	6,0	7,0	7,7
Éthanol	143	700	820	727	328	86	43
Acétate		94	107	90,5	60	4	—
Lactate	12,6	54,5	76	64	16,8	—	—
Glucose-alanine ...	18	24	44	20	18	14	—

Les mesures ont été exprimées en Q_{O_2} = µl O_2/mg d'azote. Mêmes conditions expérimentales que pour l'expérience du tableau V.

TABLEAU VIII

Activité d'oxydation de l'acétaldéhyde pour l'acétaldéhyde déshydrogénase insoluble des cellules après leur croissance sur différents substrats carbonés

Q_{O_2} pour l'acétaldéhyde déshydrogénase insoluble obtenue après culture sur :	pH de mesure						
	3,5	4,0	5,0	5,5	6,0	7,0	7,7
Éthanol	3 860	4 500	4 700	4 950	5 300	5 060	4 150
Acétate	—	2 000	2 100	2 150	2 480	2 600	2 040
Lactate	1 570	1 610	1 840	1 990	2 090	1 680	1 180
Glucose-alanine ...	1 300	1 630	1 800	2 080	2 080	1 720	1 260

Les mesures sont exprimées en Q_{O_2} = µl O_2/mg d'azote et par heure. Mêmes conditions expérimentales que pour l'expérience du tableau V.

TABLEAU IX

Activité de l'éthanol déshydrogénase et des aldéhyde déshydrogénases solubles d'Acetobacter aceti après culture sur différents substrats carbonés.

Enzymes solubles obtenues à partir de bactéries ayant poussé sur :	Éthanol déshydrogénase couplée au NAD	Éthanol déshydrogénase couplée au NADP	Aldéhyde déshydrogénase couplée au NAD	Aldéhyde déshydrogénase couplée au NADP	Rapport de l'activité: Aldéhyde déshydrogénase couplée au NADP / Aldéhyde déshydrogénase couplée au NAD
Éthanol.....	314	27	450	1 150	2,65
Acétate	220	22	344	602	1,75
Lactate	269	34	401	533	1,31
Glucose-alanine	178	33	401	1 550	3,8

Les résultats sont exprimés en Δ D.O. X 100/mg protéines et par heure à 340 nm ; les conditions expérimentales sont données dans le paragraphe "matériel et méthodes".

Pour l'acétaldéhyde-déshydrogénase, nous avons observé conformément aux résultats de RAO et GUNSALUS (1955) deux acétaldéhydes-déshydrogénases, l'une couplée au NAD et l'autre couplée au NADP.

DISCUSSION ET CONCLUSION

De manière à faciliter la discussion, nous avons résumé, figure 29, le catabolisme des substrats carbonés utilisés d'après les études de STOUTHAMER (1960) MONARD et al (1967) sur le métabolisme du glucose et de LEY et SCHELL (1962) sur le métabolisme du lactate.

Les mesures enzymatiques effectuées sur les extraits bruts appellent quelques remarques. L'oxydation de l'éthanol implique aussi l'oxydation de l'acétaldéhyde en acide acétique puisque nous n'avons pas interrompu la réaction au stade acétaldéhyde, mais, en opérant avec une quantité saturante d'éthanol et de coenzymes, la vitesse de transformation mesurée est proportionnelle à la concentration en alcool déshydrogénase. Nous avons été amenés à faire la correction de mesure $NADH_2$ oxydase ; cette correction est rendue possible car la disparition de $NADH_2$ est linéaire au cours du temps pour l'intervalle de concentration étudié. Enfin, l'action des phosphates qui peuvent exister est négligeable puisqu'on n'observe pas de formation notable de NADP dans le milieu qui comprend un excès de phosphate ; en effet, il n'y a pas d'oxydation de l'alcool déshydrogénase liée au NADP alors qu'on observe celle de l'alcool déshydrogénase liée au NAD ; cette dernière réaction est donc bien spécifique du NAD qui reste en quantité saturante dans le milieu.

Pour la souche étudiée, *A. aceti*, on observe une activité d'oxydation de l'acétaldéhyde nettement plus

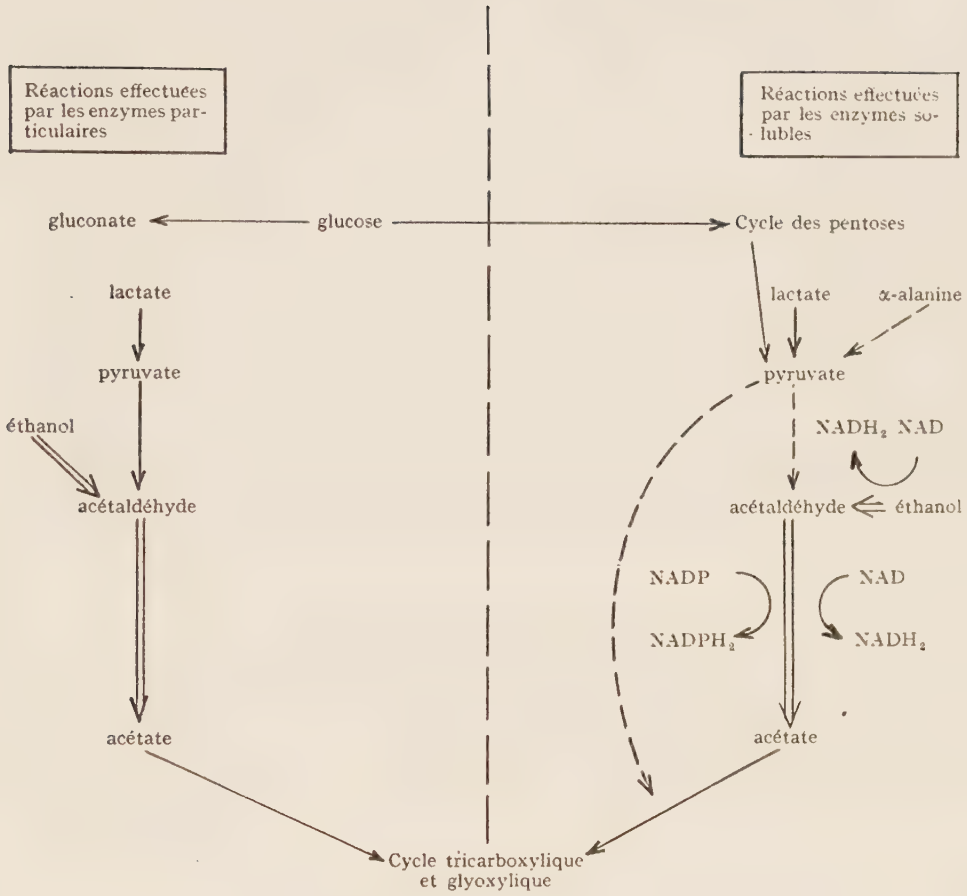

Fig. 29 : —— *Résumé synoptique du catabolisme par A. aceti des substrats carbonés utilisés.*

——— *réactions démontrées chez A. aceti*
----- *réactions hypothétiques.*
═══ *réactions étudiées*

importante que celle obtenue pour l'éthanol, que ce soit pour les cellules entières ou bien pour les extraits acellulaires solubles et insolubles.

Nous constatons que les éthanol et acétaldéhyde déshydrogénases sont des enzymes partiellement inductibles pour A. *aceti* : pour l'oxydation de l'éthanol, les mesures faites sur les cellules entières à pH = 5 montrent une diminution d'activité de 36 p. 100, 48,5 p. 100, 65,2 p. 100 si le substrat carboné de culture est l'acétate, le lactate ou le glucose à la place de l'éthanol ; le QO_2 est diminué de 86 p. 100, 63,5 p. 100 et 76,2 p. 100 à pH 7 ; sur les extraits enzymatiques insolubles à pH = 5, on observe une diminution de 87 p. 100, 90,7 p. 100, 94,7 p. 100 pour ces mêmes substrats par rapport à l'éthanol ; pour l'éthanol déshydrogénase soluble, cette activité diminue de 30 p. 100, 14,5 p. 100 et de 43,3 p. 100.

La différence est beaucoup plus marquée sur les cellules entières lorsque la mesure est effectué à pH = 7 au lieu de 5. On peut penser que l'éthanol-déshydrogénase particulaire est facilement accessible aux changements de pH externes.

Depuis les travaux de GALZY et SLONIMSKY (1955), SHIMPFESSEL (1968), nous savons que les levures ont leurs éthanol-déshydrogénases soumises à la régulation par le substrat carboné utilisé. Nous savons également que le glucose réprime particulièrement l'éthanol-déshydrogénase oxydative, c'est-à-dire l'enzyme qui assure l'entrée de l'éthanol dans le métabolisme ne l'oxydant en acétaldéhyde. De même, chez A. *aceti*, le milieu à base de glucose entraîne la plus forte répression pour les éthanol-déshydrogénases solubles et insolubles qui ont des fonctions oxydatives. Toutefois, les deux enzymes ne sont pas réprimées avec la même intensité pour la dose de glucose étudiée. C'est l'alcool déshydrogénase particulaire qui est la plus réprimée : 94,7 p. 100 à pH = 5 au lieu de 43,3 p. 100 pour l'éthanol-déshydrogénase couplée au NAD. Les effets observés pour le glucose se retrouvent pour l'acétate et le lactate.

Pour l'oxydation de l'acétaldéhyde, les mesures faites à pH = 6 sur les cellules entières montrent une diminution d'activité de 30 p. 100, 23 p. 100 et 58 p. 100 si le substrat carboné est l'acétate, le lactate ou le glucose-alanine à la place de l'éthanol ; sur les extraits enzymatiques insolubles, le QO_2 est diminué de 53 p. 100, 60,6 p. 100, 60,7 p. 100 à pH = 6, pour les mêmes substrats.

Pour les acétaldéhyde-déshydrogénases solubles liées au NAD et au NADP, on constate que les activités d'oxydation sont diminuées pour les extraits obtenus avec comme substrat carboné l'acétate, le lactate et le mélange glucose-alanine à la place de l'éthanol. Exception faite pour l'activité de l'acétaldéhyde-déshydrogénase liée au NADP obtenue avec le mélange glucose-alanine, on observe en effet une augmentation d'activité de 35 p. 100.

C'est le lactate qui réprime le plus les acétaldéhyde-déshydrogénases solubles ; ainsi l'activité liée au NAD est diminuée de 76,8 p. 100 et celle liée au NADP de 46,3 p. 100 par rapport aux activités obtenues sur éthanol. Pour ces mêmes enzymes l'acétate entraîne une diminution d'activité de 23,5 p. 100 et de 47,8 p. 100. Le mélange glucose-alanine diminue l'activité de l'acétaldéhyde-déshydrogénase liée au NAD de 10 p. 100 seulement. Ces différences constatées dans la répression des deux acétaldéhyde-déshydrogénase entraînent pour les substances ayant l'acétaldéhyde comme produit intermédiaire (éthanol, lactate, alanine) un rapport :

$$\frac{\text{Activité de l'aldéhyde-déshydrogénase couplée au NADP}}{\text{Activité de l'aldéhyde-déshydrogénase couplée au NAD}}$$

nettement supérieur à celui obtenu pour les extraits enzymatiques de cellules cultivées sur acétate.

Nous savons que généralement, le $NADPH_2$ est utilisé préférentiellement au $NADH_2$ pour les fonctions de synthèse (KAPLAN, 1963), on a donc une réponse logique à l'augmentation du rapport considéré. Ce fait expliquerait le

rôle de l'alanine, substance indispensable à la croissance sur glucose (MONARD et al, 1967) : l'alanine permettrait de fournir du $NADPH_2$ aux synthèses cellulaires.

IV - *Mise en évidence de plusieurs alcool-déshydrogénases liées respectivement au NAD et NADP chez A. mesoxydans* (DIVIES, 1972, b)

Comme nous l'avons vu au cours de la brève analyse de travaux antérieurs sur les alcool-déshydrogénases des bactéries acétiques on n'a jamais mis en évidence la multiplicité des alcool-déshydrogénases. Possédant une souche d'*A. mesoxydans* qui présentait une activité éthanol-déshydrogénase liée au NAD et une activité éthanol-déshydrogénase liée au NADP, il nous a paru intéressant de montrer la présence de plusieurs éthanol-déshydrogénases.

La culture est effectuée sur le milieu proposé par DUPUY et MAUGENET (1962) que nous décrivons dans le chapitre Matériel et Méthodes. La préparation de l'extrait soluble enzymatique est effectué comme nous l'indiquons au chapitre II.

Avant la fixation et l'élution des protéines solubles sur DEAE cellulose (DEAE - SS SERVA), on précipite les acides nucléiques par une solution normale de $MnCl_2$ à raison de 2,5 ml pour 50 ml d'extrait enzymatique. Les protéines sont ensuite concentrées par précipitation avec $(NH_4)_2SO_4$ à 80 % de saturation. Les sels sont éliminés par passage sur colonne Sephadex G 25, préalablement équilibrée avec du tampon phosphate 0,02 M à pH = 7. Les protéines sont ensuite fixées sur une colonne de DEAE cellulose de 28 x 4,7 cm conditionnée selon les indications de KERSTERS et de LEY (1966, a, b) et placée selon les

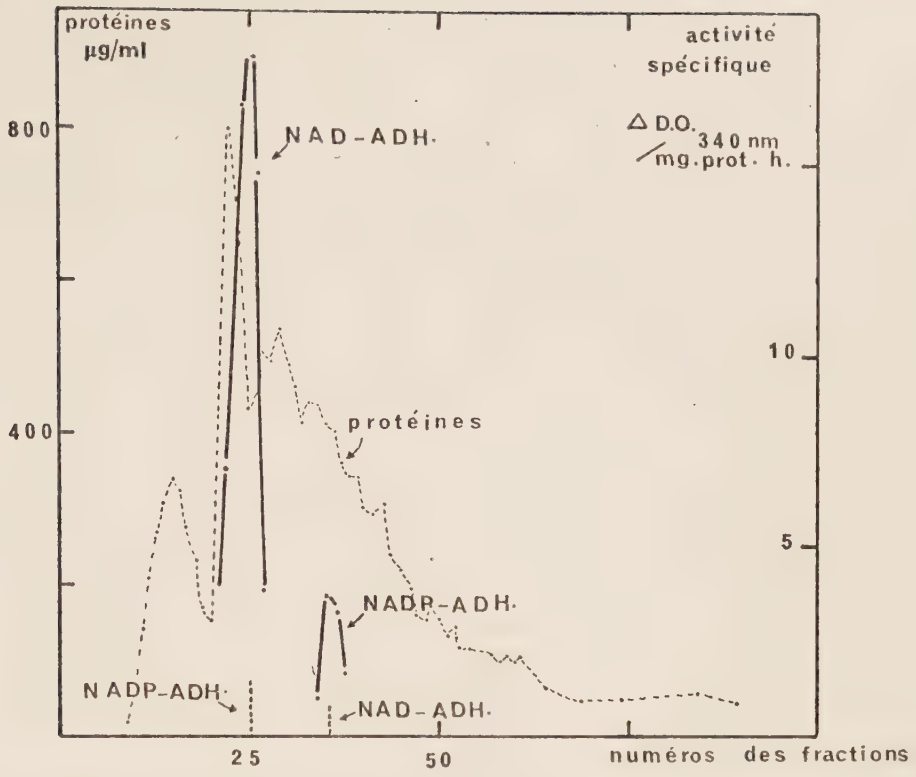

Fig. 30— Séparation par chromatographie sur DEAE cellulose des alcool déshydrogénases (ADH) d'*Acetobacter mesoxydans*. Les conditions sont décrites dans le texte. *En abscisses* : les numéros des fractions recueillies ; *en ordonnées* : à gauche la teneur en protéines des différentes fractions exprimée en µg/ml, à droite l'activité spécifique des alcool déshydrogénases exprimée en ΔDO 340 nm/mg de protéines X h. Pour la mesure des activités spécifiques le mélange réactionnel comprend : 1 ml tampon tris 0,1 M pH 8,6 ; 0,1 ml d'extrait enzymatique ; 0,1 ml NAD ou NADP $7{,}5.10^{-2}$ M ; 0,1 ml d'éthanol 9.10^{-1} M.

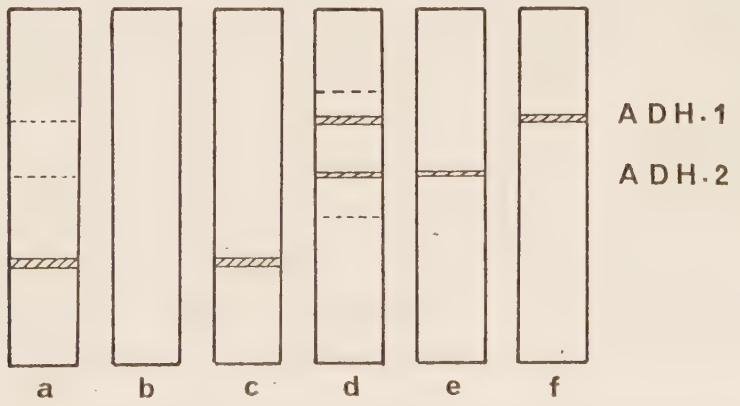

Fig. 31— Séparation des différents types d'alcool déshydrogénases sur gel d'acrylamide. La migration des protéines a eu lieu de haut en bas. — *a, b, c.* Alcool déshydrogénase liée au NADP : *a.* Révélation des extraits avant leur passage sur DEAE cellulose ; *b.* Révélation des fractions 23 à 27 ; *c.* Révélation des fractions 36 à 39. — *d, e, f.* Alcool déshydrogénase liée au NAD : *e.* Révélation des extraits avant leur passage sur DEAE cellulose ; *f.* Révélation des fractions 23 à 27. — *g.* Révélation des fractions 36 à 39. — En pointillé, on a représenté les révélations moins intenses.

froide à la température de 4°C. L'élution proprement dite est réalisée par un gradient de NaCl dans 0,02 M de tampon phosphate pH = 7. Le vase de mélange contient 200 ml de solution saline 0,05 M, et le vase d'alimentation 800 ml de solution saline 0,5 M. L'alimentation de la colonne est réalisée par une pompe"Ismatec" avec un débit de 0,8 ml/mn. Les différentes fractions sont collectées par volume de 6 ml . Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de LOWRY (1951).

Nous avons reproduit, fig. 30, le profil d'élution des protéines ainsi que l'activité spécifique des alcool-déshydrogénases détectées. Nous constatons que l'éthanol-déshydrogénase, essentiellement active sur le NAD, est collectée entre les factions 23 et 27, l'éthanol-déshydrogénase liée au NADP entre les fractions 36 et 39, la fraction 25 est faiblement active avec le NADP, la fraction 37 est faiblement active avec le NADP, la fraction 37 est faiblement active avec le NAD. Ces fractions ayant une trop faible activité pour pouvoir être analysées électrophorétiquement, nous avons été amenés à concentrer les fractions 23 à 27 et 36 à 39, respectivement dix fois par précipitation avec $(NH_4)_2SO_4$ à 80 % et reprises dans le tampon phosphate d'origine.

Les électrophorèses sur gel d'acrylamide sont faites à 5°C selon la procédé d'ORNSTEIN et DAVIS et décrit par DAVIS (1964). La révélation des différences alcool-déshydrogénases sont effectuées, en utilisant les mêmes doses de substrats, de coenzymes et de colorants que ZINK (1969).

Nous constatons, figure 31, qu'il existe sur les extraits avant leur passage sur DEAE cellulose deux bandes distinctes, intensément colorées, d'alcool déshydrogénases liées au NAD appelées ADH_1 et ADH_2, ainsi que

deux autres bandes plus faiblement colorées ; les bandes correspondant aux alcool-déshydrogénases ADH_1 et ADH_2 sont faiblement actives sur le NADP puisqu'on observe une légère coloration. Il existe aussi une alcool-déshydrogénase liée au NADP, spécifique de ce coenzyme. Dans les premières fractions concentrées, on retrouve la première bande ayant une activité alcool-déshydrogénase liée au NAD (ADH_1). Dans les deuxièmes fractions, on retrouve l'alcool-déshydrogénase liée au NADP et la deuxième bande ayant une activité alcool-déshydrogénase liée au NAD (ADH_2). Ces différents types d'alcool-déshydrogénases peuvent être séparées par précipitation fractionnée par le $(NH_4)_2SO_4$. Ainsi, l'analyse électrophorétique a montr qu'une alcool déshydrogénase liée au NAD (ADH_2) précipite essentiellement entre 20 et 30 % de saturation, l'alcool-déshydrogénase liée au NADP précipite entre 30 et 40 % de saturation et l'autre éthanol-déshydrogénase liée au NAD (ADH_1) précipite à partir de 40 % de saturation.

L'analyse électrophorétique des protéines solubles avant leur passage sur DEAE cellulose nous a aussi montré qu'il existe deux activités acétaldéhyde-déshydrogénases couplées au NAD présentant une mobilité électrophorétique différente et une activité acétaldéhyde-déshydrogénase couplée au NADP.

La question posée est de connaître la nature des différentes activités alcool et acétaldéhyde-déshydrogénases liées au NAD sont-ce des artéfacts ou non ?

Acetobacter mesoxydans possède donc en plus des déshydrogénases particulaires qui sont communes à toutes les bactéries acétiques plusieurs alcool-déshydrogénases solubles liées au NAD et au NADP.

CHAPITRE IV

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'OXYDATION DE L'ACETATE CHEZ *Acetobacter rancens*

Depuis les travaux de VISSER'T HOOFT (1925), l'oxydation de l'acide acétique est un test important pour la classification des Acetobacter. FRATEUR (1950) signale qu'avec certaines souches il est difficile d'obtenir cette oxydation. DUPUY (1957) conseille d'ajouter au milieu de culture de l'acide succinique, car cet acide favorise l'oxydation de l'acétate.

On sait aussi que dans les conditions de la vinaigrerie (PASTEUR, 1868) et dans les cultures à pH = 7 (DUPUY, 1958, b) les bactéries acétiques oxydent l'acétate lorsque l'alcool a complètement disparu du milieu. Nous avons nous-mêmes montré qu'en culture continue, *A. mesoxydans* oxyde l'acétate dans le cas où l'éthanol constitue le substrat limitant. Il nous a semblé intéressant de reprendre ces études avec *A. rancens* qui présente l'avantage d'oxyder l'acétate avec une bonne intensité.

Nous présentons d'abord brièvement les nombreuses études dont a fait l'objet le métabolisme de l'acétate chez les microorganismes ainsi que les résultats déjà obtenus chez les bactéries acétiques.

A/ LES RESULTATS ACQUIS ANTERIEUREMENT

1 - Oxydation de l'acétate, les cycles tricarboxylique et glyoxylique chez les microorganismes autres que les bactéries acétiques

Par des études isotopiques que nous ne décrirons pas, nous renvoyons le lecteur à la publication de KORNBERG et ELSEN (1961), on a pu montrer que l'oxydation de l'acétate se produit par l'intermédiaire du cycle de KREBS ou cycle des acides tricarboxyliques et par le cycle glyoxylique. Nous avons reproduit dans le schéma ci-contre (fig. 32) les principales réactions de l'oxydation de l'acétate.

En dehors des études isotopiques nous possédons des évidences enzymatiques qui soulignent l'exactitude du schéma que nous présentons.

Ainsi par exemple, chez les levures, EATON et KLEIN (1954) ont montré que l'activité d'oxydation de l'acétate est liée avec l'activité des enzymes du cycle tricarboxylique. Le cycle glyoxylique joue aussi un rôle important dans l'oxydation de l'acétate. Pour POLAKIS et BARTHEY (1965), WITT et al (1966) l'activité d'oxydation maximale de l'acétate s'acccompagne de l'apparition du cycle glyoxylique. Récemment GOSLING et DUGGAN (1971) ont démontré, toujours chez les levures, que le facteur limitant dans l'oxydation de l'acétate est bien le cycle glyoxylique et que l'augmentation de l'activité des enzymes du cycle tricarboxylique et de la teneur en cytochromes n'entraîne pas selon toute vraissemblance une augmentation dans l'activité d'oxydation de l'acétate. Après les expériences de HOLMS et BENNETT (1971) chez *E. coli* il semble de même que l'utilisation maximale de l'acétate ne peut être obtenue que lorsque les enzymes du cycle glyoxylique sont synthétisées.

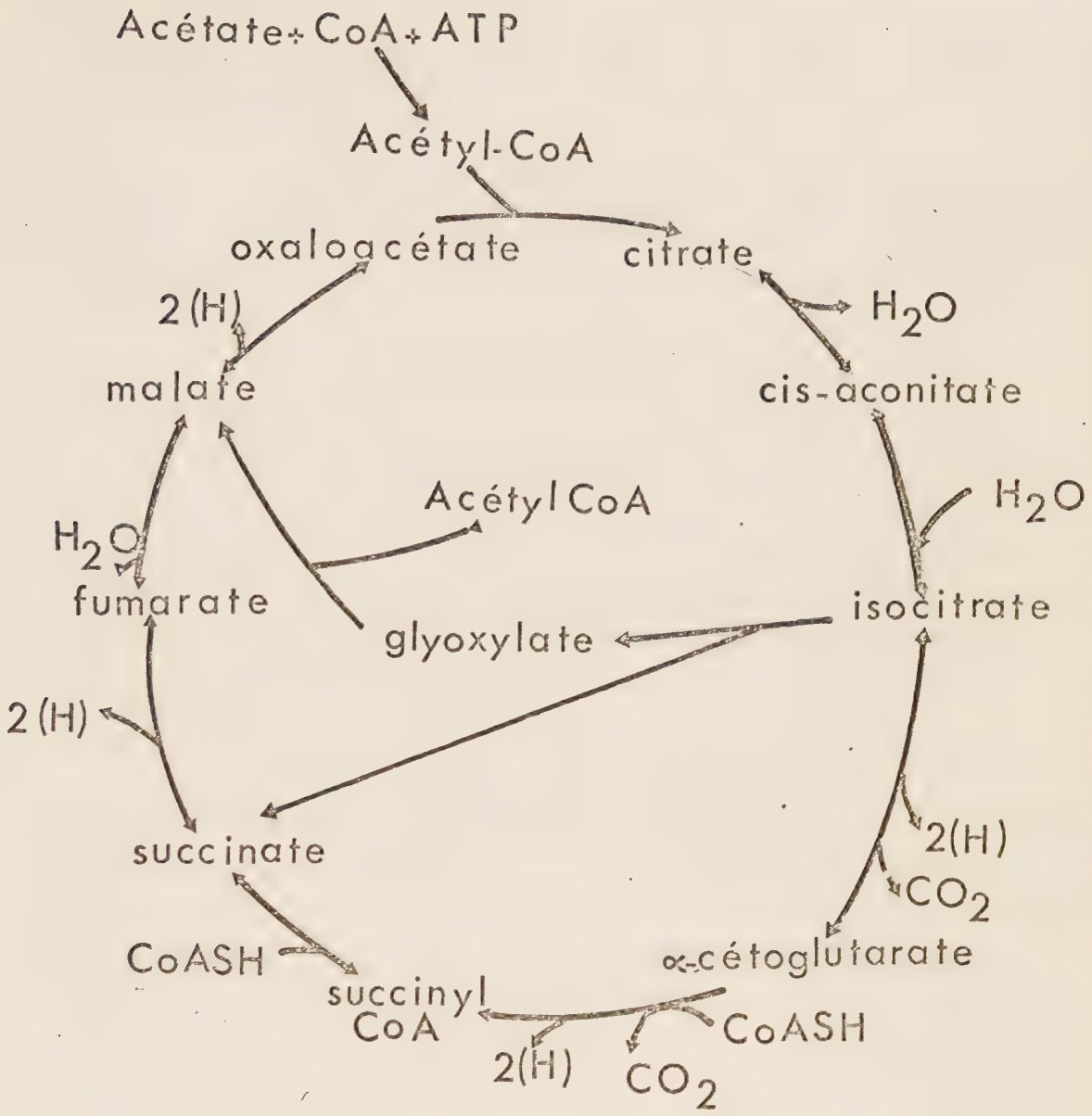

Fig. 32 : *Le cycle des acides tricarboxyliques et le cycle glyoxylique.*

Pour ce qui concerne le cycle tricarboxylique lui-même, on pense que c'est une voie métabolique dite amphibolique, c'est-à-dire qui présente des fonctions cataboliques et des fonctions anaboliques (DAVIS, 1961 ; KORNBERG, 1961).

On comprend qu'une fonction aussi diversifiée entraîne des contrôles différents. Ces contrôles peuvent s'effectuer sur la synthèse de ces enzymes et sur leur fonctionnement.

Il serait ici aussi trop long de faire une mise au point complète sur tous les résultats qui ont été publiés concernant le cycle de KREBS. Ces résultats, la plupart du temps, ne peuvent avoir un caractère de généralité. Si les réactions du cycle sont identiques pour tous les organismes, leur contrôle peut être très différent d'un organisme à l'autre.

On peut penser avec PAIGEN et WILLIAMS (1970) après les travaux de ENGLESBERG et al (1954) sur *Pasteurella pestis*, de UMBARGER (1954) sur *E. coli*, de HANSON et al (1963, 1964 et 1967) sur *E. coli* et *B. subtilis* et de GRAY et al (1966) sur *E. coli* que la synthèse des enzymes du cycle des acides tricarboxyliques est réprimée au cours de la croissance anaérobie c'est-à-dire lorsque le cycle ne peut fonctionner d'une façon catabolique. Que la répression est plus intense lorsque les deux fonctions anabolique et catabolique sont utilisées d'une façon minimale. Ainsi, l'aconitase, la succinate déshydrogénase et la fumarase sont très peu synthétisées chez *B. subtilis* 168 en présence de glucose et d'hydrolysat de caséine (HANSON et COX, 1967).

Lorsque le cycle fonctionne d'une façon anabolique parce que les précurseurs ne sont pas formés, on constate que les différentes enzymes sont en général augmentées chez *E. coli* et *Bacillus subtilis* (GRAY et al, 1966 ; HANSON et COX, 1967). Chez les levures la fonction anabolique du cycle ne paraît pas avoir beaucoup d'influence sur la synthèse des enzymes (POLAKIS et BARTLEY, 1965).

Enfin, lorsque les précurseurs sont fournis et que le cycle fonctionne de façon catabolique, les enzymes du cycle reflètent le substrat principal utilisé. Ainsi, chez *E. coli* et les levures le glucose entraîne une faible synthèse des enzymes. Alors que la croissance sur glycérol et sur pyruvate entraîne des synthèses plus importantes. Les plus hautes teneurs en enzymes sont en général observées lorsque les cultures doivent obtenir leur énergie à partir d'acides aminés oxydés par le cycle de KREBS (GRAY et al, 1966).

Par une analyse plus appronfondie, on constate que chaque enzyme du cycle prise séparément est apparemment contrôlée de façon indépendante et que ce contrôle varie selon le microorganisme étudié.

Ainsi, chez *Bacillus subtilis*, l'isocitrate déshydrogénase n'est pas réprimée par le glutamate comme l'aconitase, alors que chez *E. coli* le glutamate reprime l'aconitase, l'isocitrate déshydrogénase et la fumarase (HANSON et COX, 1967).

En ce qui concerne les enzymes du cycle glyoxylique, KORNBERG (1966) a pu montrer chez *E. coli* que l'isocitratase est réprimée par le glucose et le pyruvate et qu'elle est inhibée par le PEP et le pyruvate et chez *S. cerevisiae* (WITT et al, 1966) le glucose réprime aussi la malate synthétase et la malate déshydrogénase.

Nous savons que la participation d'une activité enzymatique à deux fonctions différentes est souvent résolue par l'existence de plusieurs enzymes différentes. Les cas du cycle glyoxylique et du cycle de KREBS en sont l'exemple parfait.

Ainsi, l'isocitratase de *Neurospora crassa* ne présente pas les mêmes caractéristiques lorsqu'elle est obtenue de cellules cultivées sur glucose et de sur acétate (SJOGREN et ROMANO, 1967). Chez *E. coli* il n'existe au moins deux malate-synthétases différentes (FALMAGNE et al, 1965).

L'isocitrate déshydrogénase est souvent trouvée chez les microorganismes comme chez les organismes supérieurs sous deux formes, une forme liée au NAD et une forme liée au NADP (COHEN, 1967 ; PLANT, 1970 ; MARR et WEBER, 1968) ont même ontré qu'il existe deux formes de l'isocitrate-déshydrogénase liée au NADP chez *E. coli*.

Au cours de ces dernières années, un nombre croissant de systèmes enzymatiques se sont révélés sensibles à l'effet soit d'activateurs, soit d'inhibiteurs de métabolites spécifiques. En ce qui concerne le cycle de KREBS, de nombreux cas de contrôle de l'activité enzymatique ont été signalés. On en trouvera de nombreux exemples dans les revues d'ATKINSON (1969) et SANWAL (1970).

ATKINSON (1968) a notamment signalé l'importance que la charge du "pool" adenylate avait sur le fonctionnement de ce cycle, notamment sur toutes les enzymes qui consomment ou qui produisent de l'ATP.

Il apparaît aussi que les coenzymes réduits $NADPH_2$ et $NADH_2$ jouent un rôle important dans les activités enzymatiques de ce cycle.

Dans une étude complète des citrate-synthétases trouvées chez les bactéries, WEITZMAN et JONES (1968) ont montré que les bactéries gram négatives avaient leur citrate-synthétases inhibées par le $NADH_2$ alors que chez les bactéries gram positives cette inhibition n'existait pas. Chez les levures par contre, l'ATP est un inhibiteur puissant de la citrate-synthétase (HATHAWAY et ATKINSON, 1965). L'AMP et le citrate sont connus comme des activateurs allostériques de nombreuses isocitrate-déshydrogénases liées au NAD ; l'ATP, le $NADH_2$ et le $NADH_2$ sont souvent des inhibiteurs (PLANT, 1970).

Récemment LIAO et ATKINSON (1971, a, b) ont souligné l'importance que la charge du "pool" adénylate pourvait avoir sur la PEP carboxylase et sur la pyruvate kinase d'*Azotobacter vinelandii*.

II - Les études des cycles tricarboxylique et glyoxylique chez les bactéries acétiques

Les études qui sont déjà entreprises chez les bactéries acétiques ont pour but d'expliquer ce qui différencie enzymologiquement les bactéries du groupe suboxydans des bactéries des autres groupes, soit de montrer la constituion enzymatique des bactéries pouvant utiliser l'éthanol comme seule source de carbone.

A. *suboxydans* est généralement considéré comme un cas unique parmi les bactéries hérotrophes aérobies strictes puisqu'elle ne paraît pas posséder un cycle tricarboxylique fonctionnel. RAO, (1955) ne parvint pas à détecter chez A. *suboxydans* d'enzymes de condensation, d'isocitrate-déshydrogénase, d'α-cétoglutarate et succinate oxydase et de malate déshydrogénase.

Par contre, il montre la présence de l'aconitase et de la fumarase. D'après WILLIAMS et RAIMBOW (1964) puis MARAGOUDAKIS et STRASSMANN (1967), A. *suboxydans* possède l'enzyme de condensation. Récemment, GREENFIELD et CLAUS (1969) montrèrent que l'activité isocitrate-déshydrogénase liée au NAD, était masquée chez A. *suboxydans* par une activité $NADH_2$ oxydase insensible au cyanure et sensible au HQNO (2 - heptyl - 4 - hydroxyquinomine), piercidine A et antimycine A (DANIEL et REDFEARN, 1968). Ainsi donc le glutamate peut être formé chez A. *suboxydans* par trois voies métaboliques différentes puisque MARAGOUDAKIS et al (1966) ont montré la réaction glyoxylate plus oxalate et SEKIZAWA et al (1966) la réaction acétate plus pyruvate.

Chez les autres types de bactéries acétiques on a pu mesurer les différentes enzymes du cycle de KREBS (WILLIAMS et RAINBOW, 1964). RAO (1955) a pu démontrer qu' A. *aceti* possède deux isocitrate-déshydrogénases, l'une liée au NAD, l'autre liée au NADP. Mais à la différence des isocitrate-déshydrogénases déjà connues, l'auteur n'observe pas d'activation avec l'AMP.

BENZIMAN (1969, b) a décrit chez A. *xylinum* une malate-déshydrogénase liée au FAD fonctionnant avec la chaîne des cytochromes probablement par l'intermédiaire d'une quinone (Q_{10}). Il semble que cette déshydrogénase ne soit pas la seule à effectuer l'oxydation de l'acide malique. WILLIAMS et RAINBOW (1964) montrèrent qu' *Acetobacter acidum-mucosum* possède une malate-déshydrogénase liée au NADP.

Pour expliquer la croissance d'A. *aceti* à partir d'éthanol comme seule source de carbone, SMITH et GUNSALUS (1955) ont montré, les premiers, l'existence d'une isocitratase chez A. *aceti*. STOUTHAMER et al (1963) confirment cette découverte en montrant la présence de la malate-synthétase mais à la différence des cultures d' *E. coli* sur acétate (KORNBERG et ELSDEN, 1961), les auteurs

ont démontré l'existence d'une glyoxylate carboligase, d'une tartronic semialdéhyde réductase et d'une glycerate kinase. Ce fait est attribué à la forte teneur en isocitratase qui accumule le glyoxylate et donc induit ces enzymes. LEISINGER (1965) dans le but de compléter la classification des bactéries acétiques a examiné leur faculté d'assimilation. Ces travaux montrent que chez ces microorganismes le besoin en facteur nutritif dépend de la nature de la source carbonée. En présence de 5 g/l d'extrait de levure, on ne retrouve pas d'activité isocitratase et malate synthétase.

B/ RESULTATS EXPERIMENTAUX

1 - Métabolisme de l'acétate pendant la culture avec l'éthanol comme premier substrat carboné

Nous avons réalisé trois cultures au pH de 3,5 ; 5,0 et 6,5 (fig. 33, 34, 35) avec des concentrations respectives d'éthanol de 15.10^{-2}M, $5,6.10^{-2}$M, $5,4.10^{-2}$M On a observé dans les trois cas qu'à un moment donné de la culture, l'éthanol a été entièrement transformé en acide acétique à 5 p. 100 près.

Le taux de croissance sur l'éthanol est maximal à pH = 5 et est égal à 0,29 ; il est sensiblement le même à pH = 3,5 et à pH = 6,5 : respectivement 0,12 et 0,14. Le taux de croissance au cours de la suroxydation de l'éthanol est de 0,009 à pH = 5 et de 0,027 à pH = 6,5. A pH= 3,5 on n'observe pas l'oxydation de l'acétate formé et la croissance des cellules s'arrête lorsque l'éthanol a disparu.

A pH = 6,5 le taux de croissance passe directement sans phase intermédiaire de 0,14 à 0,027 ; on n'observe pas de ralentissement dans l'oxydation de l'éthanol. A pH = 5, entre 21 heures et 47 heures de

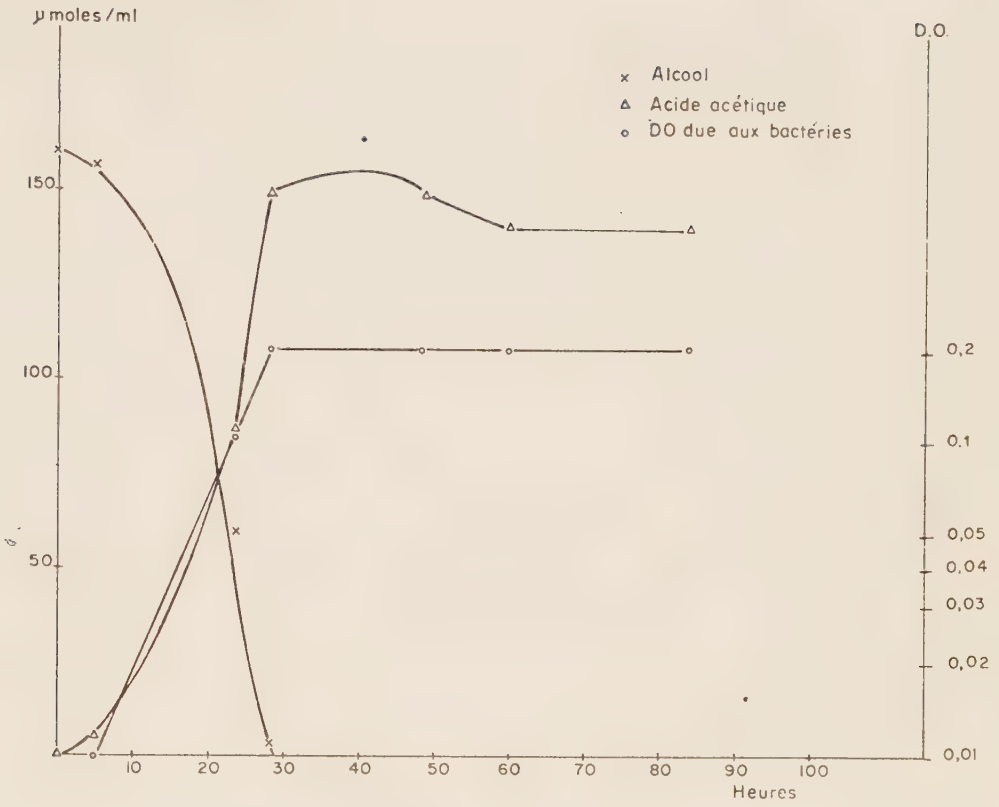

Fig. 33 : Evolution de l'éthanol, de l'acétate et de la densité optique au cours d'une culture d'A. rancens à pH = 3,5.

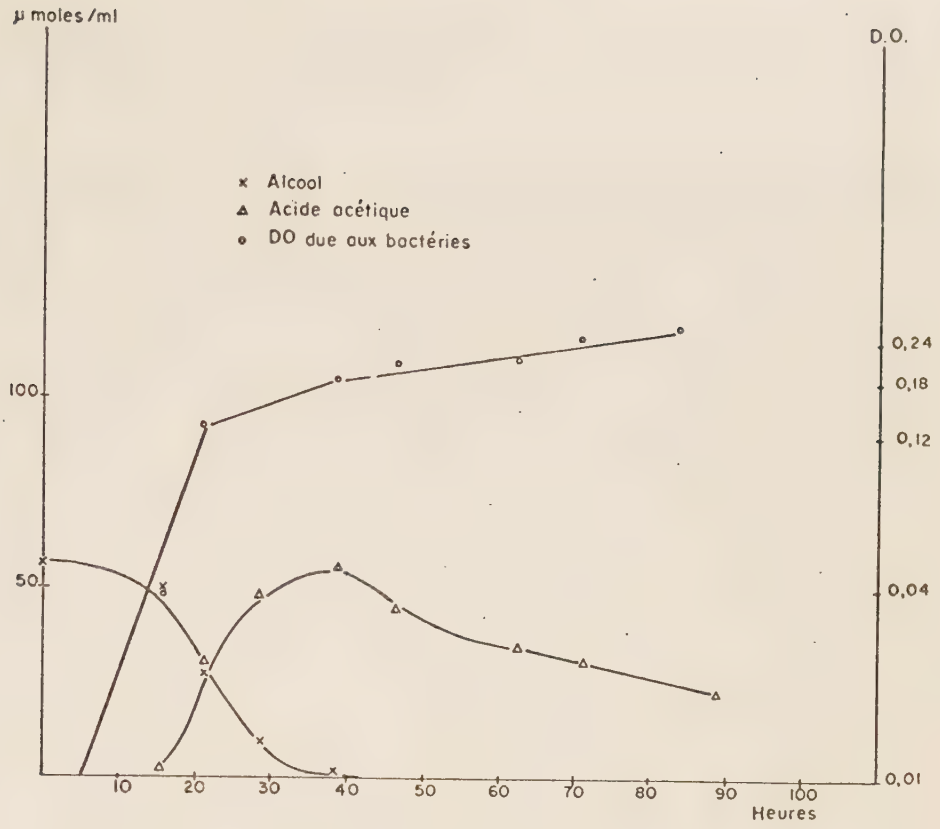

Fig. 34 : Culture d'A. rancens à pH = 5
(voir légende fig. 33)

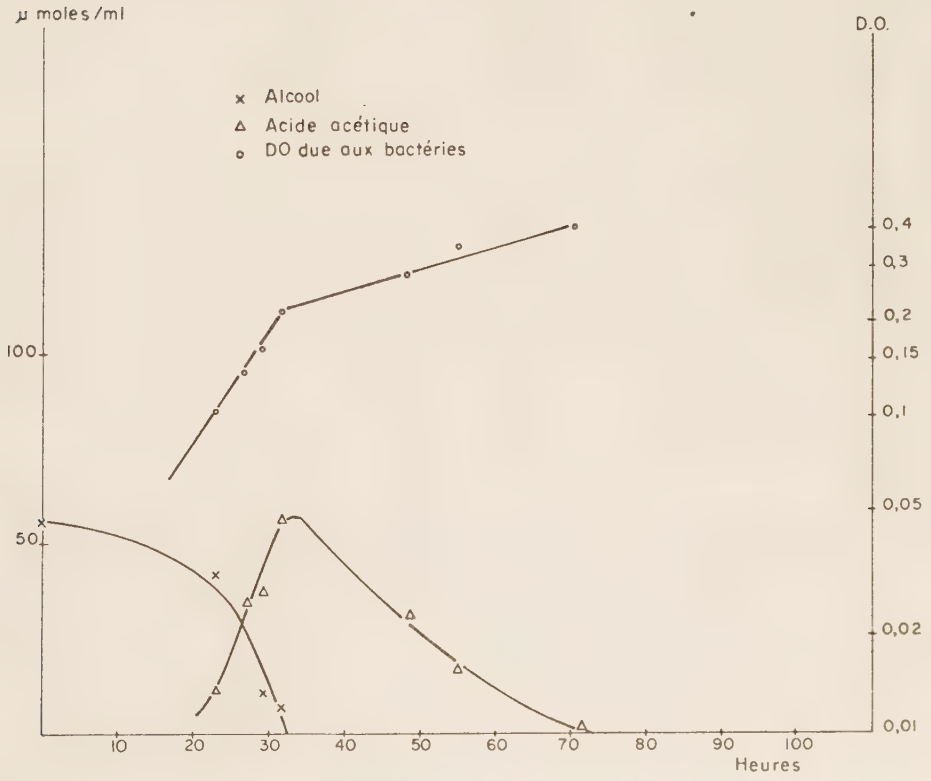

Fig. 35 : Culture d'A. rancens à pH = 6,5
(voir légende fig. 33)

culture, on observe un ralentissement dans la croissance et dans l'oxydation de l'éthanol.

Sachant que l'éthanol est entièrement transformé en acétate en utilisant une molécule d'oxygène pour cette réaction et en prenant un intervalle de mesure où la variation du poids sec n'est que de 30 p. 100 autour de la valeur moyenne, on peut calculer le QO_2 relatif à l'alcool pour les bactéries dans leur milieu de culture. Lorsque l'alcool a disparu et que l'oxydation porte uniquement sur l'acétate, on peut aussi calculer le QO_2 relatif à l'acétate. Les résultats de ces calculs sont donnés dans le tableau X.

TABLEAU X

INTENSITE RESPIRATOIRE D'A. rancens DANS LE MILIEU DE CULTURE

(QO_2 = µl O_2 par heure et par mg de la masse bactérienne exprimée en poids sec)

pH de la culture	QO_2 relatif à l'éthanol	Concentration moy. de l'éthanol en µmoles/ml (1)	QO_2 relatif à l'acétate	Concentration moy. de l'acétate en µmoles/ml (1)
3,5	4 500	110	0	140
5	3 220	45	324	33
6,5	2 130	33	840	27

(1) Concentration moy. du substrat correspondant à la période qui a servi à la mesure des QO_2.

Le milieu de culture contenant une certaine quantité d'extrait de levures qui peut servir de source de carbone aux bactéries, nous avons recherché dans quelle mesure l'éthanol participe à la fourniture du carbone cellulaire.

Nous avons donc effectué une culture d'*A. rancens* à pH 5,5 avec 51 µmoles d'éthanol (^{14}CU) ayant une activité spécifique de 4375 d. p. m. par µmoles ou de 182 d. p. m. par µg de carbone. En fin de culture lorsque l'acétate formé a été entièrement oxydé au bout de 64 heures, nous avons constaté que 0,174 mg de bactéries fixent dans leur carbone 9515 d. p. m. de carbone radioactif. D'après LURIA (1960) le poids de carbone dans les bactéries peut être estimé à 50 % du poids sec cellulaire chez les bactéries. L'activité spécifique des bactéries peut donc être estimée à 109 d. p. m. par µg de carbone. Nous pouvons donc conclure que $\frac{109}{182} \times 100 =$ 60 pour cent du carbone des bactéries provient de l'éthanol.

La croissance se fait au dépend de l'éthanol. Dans quelle mesure l'acétate néoformé participe-t-il à l'édification des cellules au cours de l'oxydation de l'éthanol ? Pour répondre à cette question nous avons suivi la fermentation acétique à pH = 5,5 après avoir introduit de l'acétate radioactif marqué en C_1 dans le milieu de culture.

Nous constatons (tableau XI) que la fixation de l'acétate se produit dès le début de la culture avant que ne commence son oxydation. Ainsi, après 17 heures de culture, la radioactivité spécifique des cellules est de 72 000 d. p. m./mg. Elle diminue ensuite parce que l'activité spécifique de l'acétate diminue dans le milieu du fait de la transformation de l'alcool non radioactif en acétate.

TABLEAU XI

EVOLUTION DE LA FERMENTATION ACETIQUE

réalisée à pH = 5,5 en présence d'acétate $^{14}C_1$

	Temps de culture				
	0	17 h	40 h	45 h	64 h
Ethanol en µmoles/ml	82	79	2	2	2
Acétate en µmoles/ml	0,1	1	71	65	39
Radioactivité du milieu filtré en d. p. m./ml	288 000	286 000	268 000	240 000	145 000
Radioactivité du milieu sous forme d'acides volatils en d. p. m./ml	288 000	228 000	219 000	200 000	118 000
Radioactivité du milieu dans le résidu de distillation en d. p. m./ml		31 000	15 200	24 000	21 600
p. 100 de la radioactivité du milieu récupérée dans l'acidité volatile et dans le résidu de distillation		90,6	87,5	93,5	96,5
Radioactivité fixée par les bactéries et par ml de milieu en d. p. m./ml		835	7 250	7 650	10 100
Poids sec de la masse bactérienne en mg/ml		0,0116	0,146	0,158	0,190
Activité spécifique des bactéries en d. p. m./mg		72 000	49 500	50 500	53 000

Action de la composition du milieu sur le rendement moléculaire de l'acétification

Aux pH = 4,5 et 6, lorsque le milieu de culture est enrichi en substances azotées, par exemple 4 g/l d'extrait de boeuf (Difco), on obtient un rendement moléculaire de transformation de l'éthanol en acétate de 60 p. 100 au lieu de 95 p. 100 dans le milieu ne contenant que 1 g/l d'extrait de levure.

A pH = 3,5, le fait d'ajouter 0,3 g/l d'acide succinique diminue de 10 p. 100 le rendement maximal de fermentation et entraîne ensuite l'oxydation de l'acétate formé qui était impossible sans cette addition.

II - Oxydation de l'acétate par les cellules non proliférantes

D'après les expériences précédentes, nous constatons qu'au cours de la croissance sur éthanol, l'acétate bien qu'assimilé dans le carbone cellulaire est accumulé et ensuite oxydé.

Afin d'avoir une mesure du système enzymatique d'oxydation de l'acétate qui peut être formé dans les cellules, nous avons déterminé la vitesse d'oxydation de l'acétate par les cellules non proliférantes obtenues dans différentes conditions.

a) Bactéries cultivées sur d'autres substrats carbonés que l'éthanol

Nous avons reproduit fig. 36 la croissance d'*A. rancens* sur d'autres substrats carbonés que l'éthanol. On constate que le lactate constitue la meilleure source de carbone.

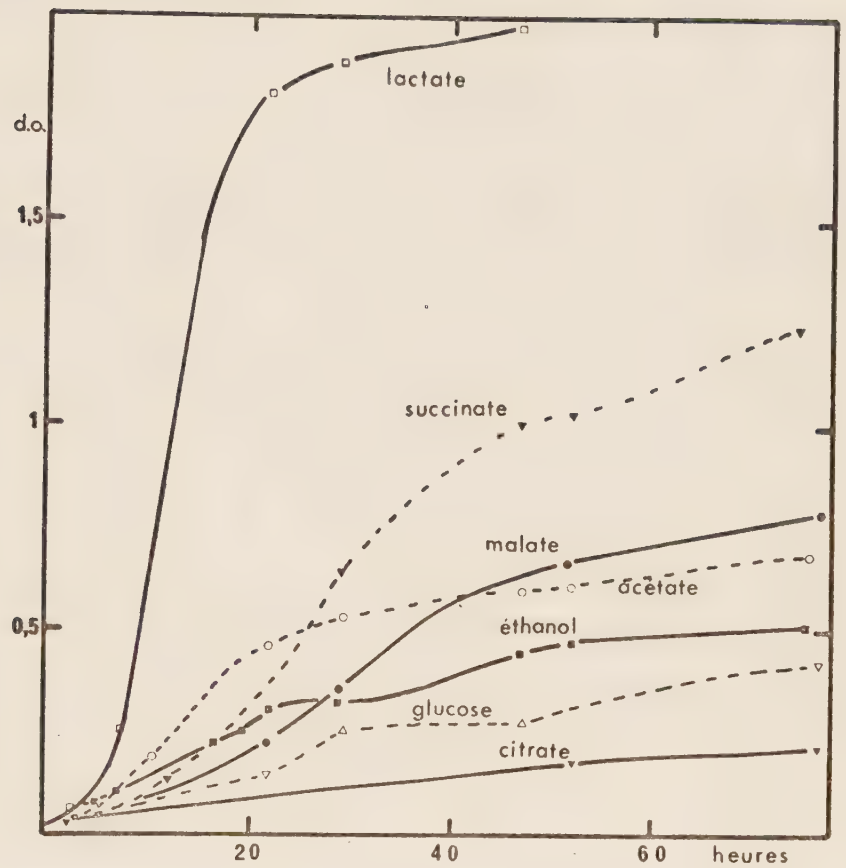

Fig. 36 : *Croissance d'A. rancens en fonction du substrat carboné. La composition du milieu est indiquée dans le chapitre matériel et méthodes. Les substrats utilisés le sont à la dose de 7,5 10^{-2} Moles/ℓ.*

L'activité d'oxydation de l'acétate des cellules non proliférantes prélevées au cours de leur phase exponentielle est portée tableau XII.

TABLEAU XII

ACTIVITE D'OXYDATION DE L'ACETATE PAR LES CELLULES NON PROLIFERANTES d'A. rancens cultivées avec différentes sources de carbone

Source carbonée	Acétate	Glucose	Lactate	Malate	Succinat
QO_2 (1)	700	465	188	470	186

(1) Le QO_2 est exprimé en $\mu l O_2$/mg bact. x heures, le pH de l'expérience est de 6, la température de 30°C, la concentration en acétate de 0,05 M/l.

b) *Bactéries cultivées sur éthanol*

Lorsque les bactéries sont cultivées sur éthanol, elles se trouvent aussi en présence d'acétate. Les résultats sont cependant différents de ceux obtenus avec les bactéries cultivées en présence d'acétate seul.

On constate (fig. 37) que le système enzymatique oxydant l'acétate est plus actif en fin de culture qu'au début.

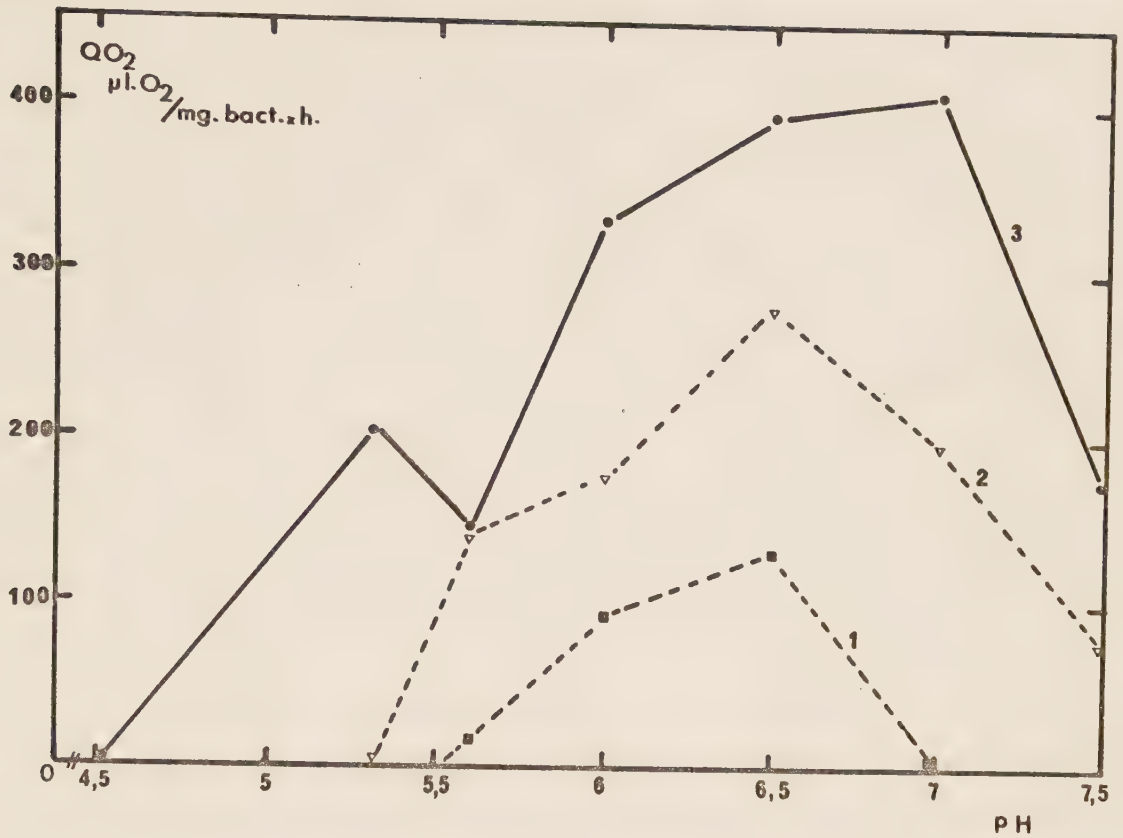

Fig. 37 : Vitesse d'oxydation de l'acétate en fonction du pH par des suspensions bactériennes prélevées au cours de leur croissance sur éthanol à pH = 6,5.

Courbes 1 et 2. L'éthanol est présent dans le milieu de culture : courbe 1 : récolte à 0,0278 mg/ml de poids sec
courbe 2 : récolte à 0,051 mg/ml de poids sec

Courbes 3. L'éthanol n'est plus présent dans le milieu de culture. récolte à 0,083 mg/ml de poids sec

Les résultats sont exprimés en µl O_2 consommés par heure à 30°C et pour un mg de poids sec (QO_2). Acétate à la concentration de 0,05 M. Tampon tartrate phosphate 0,1 M de pH = 4 à 7. Tampon phosphate 0,1 M à pH = 3,5-7,5.

Cette différence est plus marquée lorsque le pH de culture est de 6,5 au lieu de pH = 5.

III - *Etude enzymatique* (DIVIES, 1972, c)

Avant de présenter les résultats de l'étude enzymatique au cours de la croissance sur éthanol précisons que les extraits bruts d'*A. rancens* possèdent deux activités isocitrate-déshydrogénases liées respectivement au NAD et au NADP. Aisément détectables et différentiables par électrophorèse sur gel d'acrylamide selon la technique de DAVIS (1964) et la coloration proposée par BAPTIST et al (1969).

Ces deux réactions sont activées par les ions $MgCl_2$. Les extraits bruts contiennent une activité $NADH_2$ oxidase qui est inhibée en présence de KCN.

Nous présentons (fig. 38) les activités isocitrate-déshydrogénases liées au NAD et au NADP en fonction du pH dans deux tampons différents, tampon tris et tampon phosphate. Pour l'IDH-NAD on observe une nette différence d'activité entre les deux tampons, il apparaît que le pH optimum dans le tampon phosphate se situe à pH = 7 alors que pour le tampon tris, cet optimum est beaucoup plus large. A pH = 10, on obtient un nouveau maximum qui, comme nous le verrons par la suite, est plus ou moins prononcé selon le stade de prélèvement des cellules au cours de leur croissance sur éthanol.

De même l'IDH-NADP présente un pH optimum beaucoup plus large en présence du tampon tris. Nous précisons toujours le pH de mesure pour les IDH dans les tableaux que nous présentons.

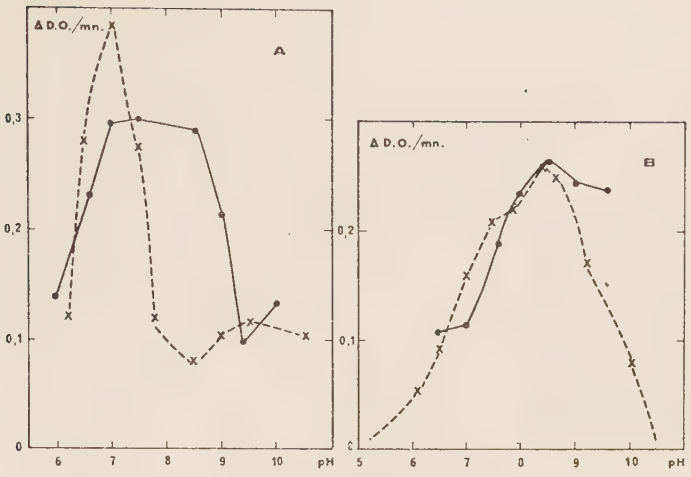

Fig. 38 : Activité en fonction du pH des isocitrate déshydrogénases liées au NAD et au NADP.

A - Isocitrate déshydrogénase liée au NAD.

En abscisse les différents pH de mesure, en ordonnée la différence de densité optique à 340 nm, obtenue après 1 mn de réaction à la température ambiante.
X- - - -X réaction dans le tampon phosphate 0,1 M.
•———• réaction dans le tampon tris 0,1 M.
Le mélange réactionnel est identique à celui indiqué dans le paragraphe matériel et méthodes. L'extrait enzymatiqu contient 6,85 mg de protéines par ml.

B - Isocitrate déshydrogénase liée au NADP.

Commentaires identiques à ceux de 38 A. L'extrait enzymatique contient 7,68 mg de protéines par ml.

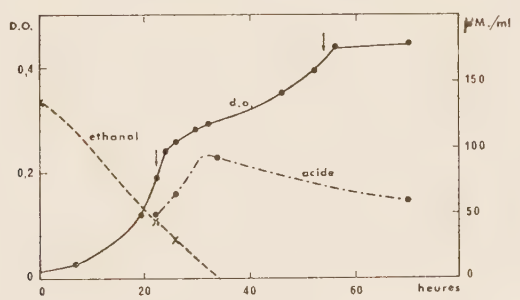

Fig. 39 : Evolution de l'éthanol, de l'acétate et de la densité optique au cours d'une culture d'A. rancens A pH 6,2.

Les flèches indiquent les moments de prélèvements des bactéries ayant servi aux dosages rapportés dans le tableau XIII.

La figure 39 représente la croissance d'*Acetobacter rancens* en présence de 135 µM/ml d'éthanol au pH = 6,2. Comme nous l'avons déjà montré, on observe deux phases de croissance, au cours de la première phase, il y a accumulation d'acétate, dans la seconde phase l'acétate accumulé est oxydé. En fin de culture il reste 60 µM/ml d'acétate ; c'est que vraisemblablement il manque un élément nutritif dans le milieu si bien que tout l'acétate produit n'est pas utilisé.

On remarque aussi qu'en partant de 135 µM/ml d'éthanol on retrouve seulement 94 µM/ml d'acide acétique accumulées. Nous pensons que cette différence par rapport aux résultats que nous avons présentés vient du fait que l'évaporation de l'éthanol au cours de la culture dans un fermenteur est beaucoup plus intense qu'en culture agitée.

Nous avons représenté par une flèche le prélèvement des bactéries qui ont servi pour les mesures rapportées tableau XIII. On constate que le QO_2 sur acétate des cellules non proliférantes a considérablement augmenté corrélativement à l'augmentation d'activité de la majorité des enzymes du cycle tricarboxylique.

La culture sur éthanol dure environ 60 heures. Dans le but de suivre le phénomène d'adaptation à l'oxydation de l'acétate sur un temps beaucoup plus restreint et mieux contrôlé, nous avons imaginé de récolter les cellules au cours de leur croissance sur éthanol et de les placer, après centrifugation, dans un milieu analogue contenant 50 mM/l d'acétate au pH de 6 et dans un milieu sans acétate. Nous rapportons (fig. 40) la croissance et l'oxydation obtenues sur ce nouveau milieu. L'on constate qu'en présence d'acétate, le QO_2 sur acétate des cellules non proliférantes passe de 1,74 à 23,2 µM O_2/mg heure en 255 mn, alors que dans le milieu sans acétate, le QO_2 passe de 1,74 à 13,9 dans le même temps.

TABLEAU XIII

Activités enzymatiques et oxydation de l'acétate des extraits et des cellules non proliférantes d'A. rancens prélevées au cours de la culture de la figure 39.

Enzymes	Produits formés ou transformés	Activités spécifiques exprimées en µmoles par heure et par mg de protéines	
		Ethanol présent	Ethanol absent
Aceto-CoA synthétase..	Acétyl-CoA	0,117	0,0672
Citrate synthétase.....	Acétyl-CoA	6,35	26,4
Aconitase	Cis-aconitate	16	21
Isocitrate déshydrogénase liée au NAD	Isocitrate	10	22
Isocitrate déshydrogénase liée au NADP...	Isocitrate	33	106
α-cétoglutarate déshydrogénase	α-cétoglutarate	0,54	0,56
Succinate déshydrogénase.....	Succinate	0,54	0,49
Fumarase	Fumarate	8,9	13
Malate déshydrogénase	Malate	2,75	4,7
Pyruvate déshydrogénase.....	Pyruvate	0,72	0,63
Isocitratase.....	Semicarbazide du glyoxylate	3	5,5
Oxydation de l'acétate par cellules non proliférantes : QO_2		2,37	16,9

Les conditions de dosage sont indiquées dans le chapitre matériel et méthodes.

Pour une expérience identique, nous rapportons (fig. 41 et 42) l'évolution de l'activité spécifique des différentes enzymes du cycle tricarboxylique dans des extraits effectués au cours de l'adaptation à l'oxydation de l'acétate.

En ce qui concerne l'isocitrate-déshydrogénase liée au NAD, nous constatons pour le résultat présenté sur la figure 43 qu'à pH = 10 l'activité spécifique est supérieure lorsque les cellules ne sont pas adaptées à l'acétate, alors qu'à pH = 7 le phénomène est inversé.

On observe (fig. 41 et 42) que toutes les enzymes dosées voient leur activité généralement accrue, à l'exception de l'acéto-CoA-synthétase, de l'α-cétoglutarate-déshydrogénase et de la malate-synthétase. Le QO_2 d'oxydation de l'acétate est augmenté d'un facteur de 8,25 ; aucune enzyme n'est augmentée dans cette proportion. Dans nos conditions de dosage, l'on observe sur la figure 42 que l'enzyme qui croît d'une façon régulière est l'isocitrate-déshydrogénase liée au NADP. Sa mesure paraît représenter le meilleur indice d'aptitude des cellules à oxyder l'acétate. Remarquons que c'est cette enzyme qui possède la plus grande activité spécifique : 125 µM d'isocitrate transformées par heure et par mg de protéines (prélèvement n°5, fig. 42).

Action du chloramphénicol

Le tableau XIV donne le résultat d'une expérience dans laquelle les cellules ont été placées pendant 240 mn dans le nouveau milieu avec acétate en présence et en absence de chloramphénicol utilisé (50 γ/ml), l'adaptation à l'oxydation de l'acétate paraît considérablement ralentie. Toutefois, l'activité spécifique des enzymes dosées et la vitesse d'oxydation de l'acétate sont légèrement augmentées. Dans le but d'accroître l'efficacité

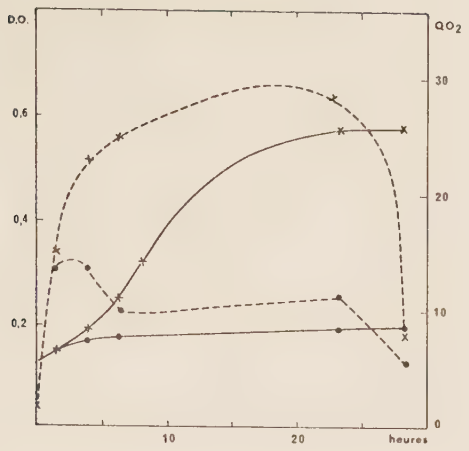

Fig. 40

— Evolution de la densité optique et de la faculté d'oxydation de l'acétate des cellules d'A. rancens cultivées à pH 6 dans le milieu de culture sans et avec 50 mM/l d'acétate.

L'ensemencement est réalisé avec des cellules effectuant leur croissance sur éthanol au pH de 6.

Le QO_2 représente les µM d'O_2 consommées à 30°C par heure et pour un mg de poids sec des cellules prélevées aux différents stades de la culture.

×———× QO_2 culture avec acétate.
×———× densité optique culture avec acétate.
●———● QO_2 culture sans acétate.
●———● densité optique culture sans acétate.

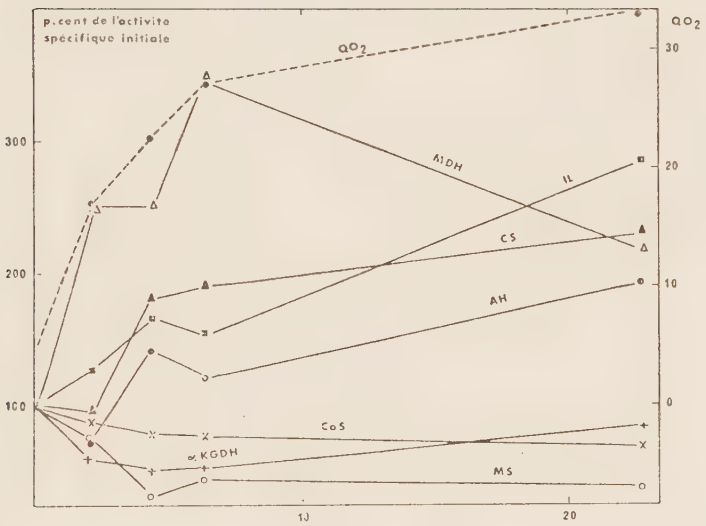

Fig. 41

— Evolution de l'activité spécifique des enzymes des cycles tricarboxylique et glyoxylique au cours de l'adaptation à l'oxydation de l'acétate dans le milieu de culture avec 50 mM/l d'acétate.

Conditions identiques à la figure n°40.

Signification des abréviations et valeurs des activités spécifiques initiales exprimées en µM de substrat transformé par heure et par mg de protéines :

AH = aconitase (21,8 µM) ; CoS = Aceto-CoA-synthétase (0,099 µM) ; CS = citrate synthétase (8,95 µM) ; IL = isocitritase (3,28 µM) ; α-KGDH = α-cétoglutarate déshydrogénase (0,93 µM) ; MDH = Malate déshydrogénase liée au FAD (3,36 µM) ; MS = malate synthétase (2,61 µM).

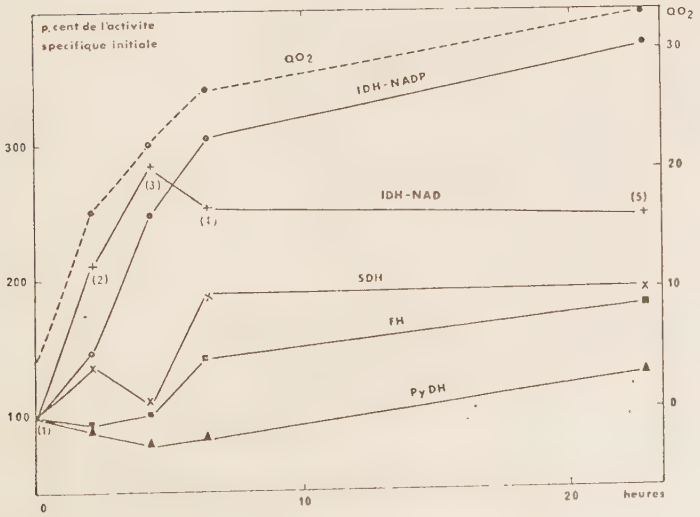

Fig. 42

— Evolution de l'activité spécifique des enzymes du cycle tricarboxylique au cours de l'adaptation à l'oxydation de l'acétate dans le milieu de culture avec 50 mM/l d'acétate.

Conditions identiques à la figure n° 40.

Signification des abréviations et valeurs des activités spécifiques initiales exprimées en µM de substrat transformé par heure et par mg de protéines : FH = fumarase (12,9 µM) ; IDH-NAD = isocitrate déshydrogénase liée au NAD (9,8 µM) ; IDH-NADP = isocitrate déshydrogénase liée au NADP (33,2 µM) ; PyDH = pyruvate déshydrogénase (0,62 µM) ; SDH = succinate déshydrogénase (0,585 µM).

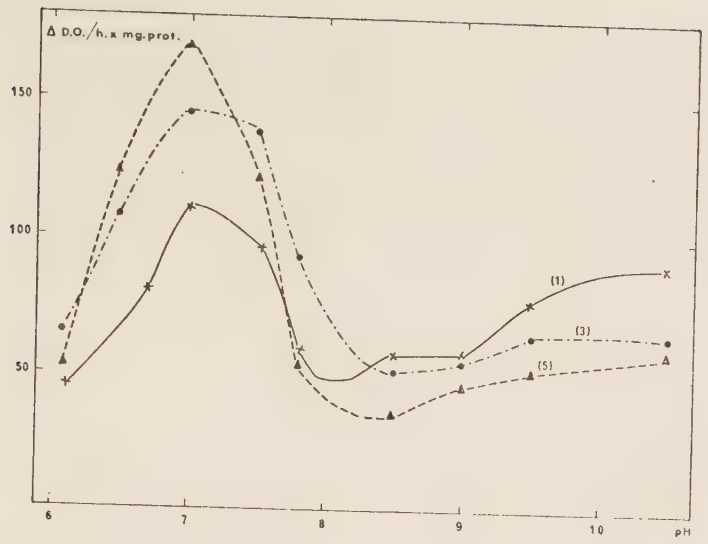

Fig. 43

— *Activité de l'isocitrate déshydrogénase liée au NAD en fonction du pH au cours de l'adaptation à l'oxydation de l'acétate.*

Le numéro des courbes représente le numéro des extraits rapportés figure 42

TABLEAU XIV

Action du chloramphénicol sur l'adaptation à l'oxydation de l'acétate.

Enzymes	Activités spécifiques exprimées en μ moles de produits transformés par heure et par mg de protéines		
	1	2	3
Acéto-CoA synthétase.....	0,108	0,144	0,256
Citrate synthétase.....	4,3	5,3	9,4
Aconitase	12,85	24,8	31,4
Isocitrate déshydrogénase liée au NAD à pH = 7.....	11	15	16,8
Isocitrate déshydrogénase liée au NADP.....	32,7	54,5	77,2
α-cétoglutarate déshydrogénase.....	0,372	0,535	0,455
Succinate déshydrogénase....	0,675	1,05	0,985
Fumarase	7,2	17,9	21,5
Malate déshydrogénase.....	1,85	2,36	2,72
pyruvate déshydrogénase	0,354	0,49	0,475
Isocitritase.....	2,44	4,1	7,16
Malate synthétase.....	4,6	5,7	5
Oxydation de l'acétate par les cellules non proliférantes (QO_2).....	1,34	7,7	23,4

1 — Cellules prélevées au cours de leur croissance sur éthanol.

2 et 3 — Cellules après 240 mn de traitement dans le milieu de culture contenant 50 mM/l d'acétate au pH = 6 ; en 2 le milieu contient en plus 50 γ/ml de chloramphénicol.

du traitement par le chloramphénicol, nous avons utilisé des doses allant jusqu'à 300 γ/ml et réalisé le traitement avec une incubation préliminaire de 10 mn dans l'eau physiologique contenant le chloramphénicol. Les résultats mentionnés tableau XIV n'ont pas été modifiés.

IV - Inhibition de l'oxydation de l'acétate par l'éthanol

Nous avons vu que l'éthanol diminue la synthèse des enzymes participant à l'oxydation de l'acétate, si bien que les cellules qui se développent en présence d'éthanol oxydent beaucoup moins l'acétate que les cellules qui se développent en présence d'acétate. Nous reviendrons dans la discussion sur cette action de l'éthanol.

L'éthanol inhibe-t-il aussi l'oxydation de l'acétate ? Si l'éthanol n'intervenait pas dans cette oxydation, on devrait constater que les cellules mises en présence d'acétate marqué oxydent ce dernier de la même façon en présence et en absence d'éthanol. En utilisant la méthode manométrique de WARBURG on peut mesurer en même temps la consommation d'oxygène et arrêter la réaction par l'acide trichloracétique dès que quelques µmoles d'oxygène ont été consommées. L'éthanol étant d'abord oxydé en acide acétique, il faut en effet éviter une trop grande dilution de l'acétate marqué initialement introduit.

Le $^{14}CO_2$ provenant de l'oxydation de l'acétate est piégé dans 0,2 ml de NaOH, 2 N. A la fin de l'expérience 0,1 ml de la solution de soude est introduite dans le mélange scintillant proposé par MURRAY (1971). Nous donnons la composition de ce mélange dans le chapitre

TABLEAU XV

Bilan de l'oxydation de l'acétate ($^{14}C_1$) en présence de différents substrats carbonés pour les cellules non adaptées à l'oxydation de l'acétate.

Numéros des fioles		1	2	3	4	5
µ Moles de substrat dans chaque fiole	acétate $^{14}C_1$	60	60	60	60	60
	α-cétoglutarate	0	150	0	0	0
	éthanol	0	0	150	0	0
	glucose	0	0	0	150	0
	lactate	0	0	0	0	150
Radioactivité introduite sous forme d'acétate $^{14}C_1$ en d.p.m.		861.000	861.000	861.000	861.000	861.000
Radioactivité récupérée sous forme de Na_2CO_3 en fin de réaction en d.p.m.		16.300	38.700	2.220	14.300	23.600
après		43 mn	31 mn	20 mn	22 mn	24 mn
µ Moles d'O_2 consommées en fin de réaction		1,99	5,8	6,05	5,3	4,33
P. cent de radioactivité récupérée après un temps identique de réaction par rapport à la fiole où l'acétate $^{14}C_1$ est seul		100	329	283	172	260

Les cellules utilisées pour cette expérience ont été prélevées alors qu'il restait de l'éthanol dans leur milieu de culture.
Les conditions de mesures par la méthode manométrique de Warburg sont indiquées dans le chapitre matériel et méthodes.

TABLEAU XVI

Bilan de l'oxydation de l'acétate ($^{14}C_1$) en présence de différents substrats carbonés pour les cellules adaptées à l'oxydation de l'acétate.

Numéros des fioles		1	2	3	4	5
µ Moles de substrats dans chaque fiole	acétate $^{14}C_1$	60	60	60	60	60
	α-cétoglutarats	0	150	0	0	0
	éthanol	0	0	150	0	0
	glucose	0	0	0	150	0
	lactate	0	0	0	0	150
Radioactivité introduite sous forme d'acétate $^{14}C_1$ en d.p.m		861.000	861.000	861.000	861.000	861.000
Radioactivité récupérée sous forme de Na_2CO_3 en fin de réaction en d.p.m.		39.500	33.800	10.300	20.000	35.400
après		24 mn	23 mn	15 mn	21 mn	19 mn
µ Moles d'0_2 consommées en fin de réaction		5,65	5,1	4,15	4,32	4,08
P. cent de radioactivité récupérée après un temps identique de réaction par rapport à la fiole où l'acétate $^{14}C_1$ est seul		100	89,5	41,5	58	113

- Les cellules utilisées pour cette expérience ont été prélevées alors qu'il ne restait plus d'éthanol dans leur milieu de culture.
Les autres conditions sont identiques au tableau XV.

Matériel et Méthodes. Dans nos conditions de comptage, les rendements de comptages sont voisins de 63 p. cent. Les solutions sont stables au cours du temps.

Nous présentons (tabl. XV et XVI) le résultat de deux expériences montrant l'oxydation de l'acétate (1-^{14}C) en présence de différents substrats carbonés. Dans le tableau XV les cellules ont été prélevées alors qu'il restait de l'éthanol dans le milieu de culture. Les cellules utilisées pour l'expérience rapportée au tableau XVI sont adaptées à l'oxydation de l'acétate.

On constate, pour les fioles n°1 que l'on récupère respectivement 110 et 98 p. cent du $^{14}CO_2$ attendu d'après la réaction : $CH_3\text{-}COOH + 2\ O_2 \longrightarrow 2\ CO_2 + H_2O$. Si l'$\alpha$-cétoglutarate, l'éthanol, le glucose et le lactate n'ont aucune influence sur l'oxydation de l'acétate, pour des temps identiques de réaction on doit retrouver la même quantité de CO_2 marqué dans la soude.

Pour les deux expériences rapportées, on constate que c'est l'éthanol qui entraîne la plus forte inhibition de l'oxydation de l'acétate. Cette forte inhibition ne peut être attribuée à l'acétate non marqué qui peut s'accumuler. Cette quantité est au maximum égale à 6,05 µM pour l'expérience du tableau XV soit seulement 11 p. cent de l'acétate en fin de réaction.

On observe entre les deux types de cellules utilisées une nette différence dans l'activation de l'oxydation de l'acétate ; nous avons consigné (tabl. XVII) les QO_2 observés.

TABLEAU XVII

Vitesses d'oxydation pour différents substrats des cellules adaptées et non adaptées à l'oxydation de l'acétate.

Numéros des fioles		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Substrats : concentration par fioles en mM/l	acétate	30	0	0	0	0	30	30	30	30
	α-cétoglutarate	0	75	0	0	0	75	0	0	0
	éthanol	0	0	75	0	0	0	75	0	0
	glucose	0	0	0	75	0	0	0	75	0
	lactate	0	0	0	0	75	0	0	0	75
μ Moles d'O_2 consommées par mg de bactéries en poids sec et par heure : QO_2	bactéries du tableau XV	5,9	0	30,6	27,3	9,9	22,8	31,9	26,1	21
	bactéries du tableau XVI	27,2	6,9	33,6	36,2	13,5	26,6	32,8	25,2	27,5

Les conditions expérimentales sont identiques au tableau XV.

TABLEAU XVIII

Action de la concentration en éthanol sur l'oxydation de l'acétate ($14C_1$) pour les cellules adaptées à l'oxydation de l'acétate.

Numéros des fioles		1	2	3	4	5	6
Concentration par fioles en mM/l	acétate $^{14}C_1$	20	20	20	20	20	20
	éthanol	0	300	150	30	15	7,5
Radioactivité introduite sous forme d'acétate $^{14}C_1$		860.000	860.000	860.000	860.000	860.000	860.000
Radioactivité récupérée sous forme de Na_2CO_3 dans 0,2 ml de NaOH à la fin de la réaction en d.p.m.		21.000	3.120	5.540	3.350	3.780	3.170
	après	21 mn	14 mn	23 mn	12 mn	18 mn	16 mn
μ Moles O_2 consommées à la fin de la réaction		2,12	3,78	6,65	3,7	4,12	3,53
P. cent de la radioactivité récupérée après un temps identique de réaction par rapport à la fiole où l'acétate est seul		100	22,2	24	27,8	20,9	19,8
μ Moles O_2 consommées par mg de bactéries en poids sec et par heure : QO_2		24,8	56,5	63,5	69	52	53,7

Les autres conditions expérimentales sont identiques au tableau XV.

DISCUSSION ET CONCLUSION

En ce qui concerne les résultats des dosages que nous avons effectués, nous apporterons quelques commentaires. Il paraît y avoir une corrélation entre l'activité spécifique des enzymes du cycle tricarboxylique et l'activité d'oxydation de l'acétate.

A la différence d'*Acetobacter aceti*, qui est capable de se développer avec l'éthanol ou l'acétate comme source carbonée et des sels d'ammonium comme source azotée, on n'observe pas d'activité malate-synthétase importante chez A. *rancens*. Nous avons vérifié, sur la souche d' *Acetobacter aceti* NCIB 8554 que nous possédons, une activité malate-synthétase 20 fois plus importante. Cette activité de 21,4 µM d'acétyl CoA transformées en présence d'acide glyoxylique est du même ordre de grandeur que l'activité spécifique donnée par MONARD (1968). En ce qui concerne les activités de l'isocitrate lyase, le chiffre d'A. *rancens* qui présente une activité spécifique de 5 µM est éloigné des 37,2 µM d'isocitrate transformées par *A. aceti* (STOUTHAMER, 1963).

A. *rancens* qui possède les enzymes du cycle glyoxylique ne paraît donc pas les avoir en quantité suffisante pour satisfaire une croissance sur le milieu de HOYER (FRATEUR, 1950) en présence d'éthanol. Au cours de la croissance sur acétate et dans l'adaptation à l'oxydation de l'acétate, l'activité de l'isocitratase est augmentée, pour l'expérience rapportée (fig. 41) de 3,28 à 9,4 µM, alors que l'activité de la malate-synthètase dosée diminue.

Lors de l'adaptation à l'utilisation de l'acétate par *E. coli* ML 308 (A CC 15224), HOLMS et BENNETT (1971) ont aussi constaté une augmentation de l'activité de l'isocitrate lyase, mais une diminution corrélative de l'isocitrate-déshydrogénase liée au NADP. Chez les levures, dans une autre expérience d'adaptation, GOSLING

et DUGGAN (1971) pensent aussi que l'adaptation à l'oxydation de l'acétate est due à l'augmentation de l'activité de l'isocitrate lyase. Ces auteurs ont aussi constaté que les activités isocitrate-déshydrogénases liées au NADP et au NAD n'augmentaient pas mais, au contraire, diminuaient.

L'adaptation à l'oxydation de l'acétate chez A. *rancens* s'accompagne, par contre, d'un fort accroissement de l'isocitrate-déshydrogénase liée au NADP (fig. 42). Son activité spécifique qui est la plus élevée de toutes les enzymes dosées passe (fig. 42) de 33,2 µM à 125 µM d'isocitrate transformées par heure et par mg de protéines. L'activité spécifique de l'isocitrate-déshydrogénase liée au NAD augmente aussi mais d'une façon moindre.

L'analyse des courbes concernant l'activité de l'isocitrate-déshydrogénase liée au NAD (fig. 43) conduit à proposer la présence possible de deux isocitrate-déshydrogénases. Toutefois, la confirmation doit être effectuée par la séparation des deux activités concernées.

Notons que l'isocitrate-déshydrogénase liée au NADP que nous décrivons apparaît différente de l'isocitrate-déshydrogénase liée au NADP décrite par RAO (1955). Cet auteur remarquait que l'isocitrate-déshydrogénase d' A. *aceti* n'était pas activée par les ions Mn^{++} et avait un pH optimum de 7,4.

Nos résultats nous montrent que l'éthanol agit à deux niveaux sur l'oxydation de l'acétate. L'éthanol a une action sur la synthèse des enzymes, du cycle de Krebs, et il inhibe l'oxydation de l'acétate par les cellules non proliférantes. Pour la synthèse des enzymes qui participent à l'oxydation de l'acétate en l'occurence

les enzymes du cycle tricarboxylique l'action de l'éthanol ne paraît pas très spécifique. Cet effet de l'éthanol peut être comparé à l'effet glucose ou répression catabolique du moins en ce qui concerne les enzymes du cycle tricarboxylique (PAIGEN et WILLIAMS, 1970) si l'on considère son action peu spécifique. Notre comparaison avec l'effet glucose ne constitue qu'une hypothèse de travail. C'est pourquoi, nous nous bornons simplement à parler que de l'inhibition de la synthèse des enzymes par l'éthanol.

Nous avons, d'autre part, observé que le chloramphénicol ne supprime pas complètement l'adaptation à l'oxydation de l'acétate (tableau XIV) quelles que soient les modalités du traitement. Il est maintenant bien connu que le chloramphénicol est un inhibiteur de la synthèse des protéines au niveau de la lecture de l'ARN messager. Ce qui nous conduit à penser que l'éthanol ou un produit du métabolisme cellulaire exerce une inhibition dans l'activité des enzymes dosés.

Outre l'inhibition de la synthèse des enzymes du cycle tricarboxylique, l'éthanol inhibe l'oxydation de l'acétate par les cellules non proliférantes à la différence de l'α-cétoglutarate, du lactate et du glucose. L'explication de ce phénomène n'est pas aisée. Nous avons vu (tableau XI) que l'éthanol ne supprimait pas l'utilisation de l'acétate externe par les cellules en croissance, en l'état actuel de notre expérimentation on ne peut cependant pas exclure une action de l'éthanol sur la pénétration de l'acétate dans les cellules. L'autre hypothèse est de penser à une action directe ou indirecte de l'éthanol sur le fonctionnement d'un ou des enzymes participant à l'oxydation de l'acétate. Ces dernières années, de nombreux cas de contrôles de l'activité enzymatique ont été signalés pour les enzymes du cycle tricarboxylique. ATKINSON (1968) a notamment montré l'importance du "pool" adénylate sur le fonctionnement de ce cycle. On possède aussi de nombreux exemples montrant le rôle des coenzymes réduits sur le fonctionnement de ce cycle (SANWALL, 1970).

On peut donc imaginer que l'oxydation de l'éthanol, en produisant par l'intermédiaire des alcool et acétaldéhyde-déshydrogénases solubles des coenzymes réduits, pourrait inhiber le fonctionnement de ce cycle, comme il le fait dans le foie de rat sous perfusion. WILLIAMSON et al (1969) ont, en effet, montré que le NADH formé au cours de l'oxydation de l'éthanol inhibait l'activité du cycle tricarboxylique, notamment au niveau de la citrate synthase et de l'isocitrate-déshydrogénase. Une étude des propriétés particulaires des différentes enzymes du cycle tricarboxylique chez A. *rancens* doit donc être entreprise afin de préciser le mode d'action de l'éthanol sur ces enzymes dans le cas qui nous préoccupe.

R E S U M E

L'étude qui suit a été entreprise afin de mieux connaître la production d'acide acétique et le métabolisme de l'éthanol chez les bactéries acétiques.

* * *

J'ai étudié dans la première partie, la cinétique de production d'acide acétique en culture discontinue et en culture continue, à l'aide de deux souches de bactéries acétiques isolées dans le "fermenteur" d'une vinaigrerie. En culture discontinue, la croissance des bactéries et la production d'acide sont liées par une relation du type : $\frac{dP}{dt} \times \frac{1}{N} = a\mu + b$ (1). Dans cette relation, P représente la concentration en acide, N la concentration en bactéries, μ le taux de croissance népérien, t le temps, a et b deux constantes, a est exprimé en µmoles d'acide formées par unité de densité optique, c'est l'inverse du véritable rendement de croissance (Y_G), b est exprimé en µmoles d'acide produit par heure et par unité de densité optique, c'est le coefficient représentant l'énergie de maintien nécessaire aux cellules. En culture continue la relation obtenue en culture discontinue devient $\frac{PD}{N} = aD + b$ (2), où D représente le taux de dilution (h^{-1}). Dans le cas où l'éthanol ne constitue pas le facteur nutritif limitant, on observe des oscillations dans la population et l'acidité qui sont variables selon le taux de dilution. A l'état d'équilibre la relation (2) peut se mettre sous

la forme $D = a_o e^{-K_1 T} - P. b_o e^{-K_2 T}$, T représente la teneur en acide acétique et en éthanol du milieu de culture, a_o , b_o , K_1 , K_2 sont des constantes expérimentales. Si bien que la productivité optimale du fermenteur (P.D.) est liée au taux de dilution par une relation du type $D = m e^{h(P.D.)}$, m et h représentant deux constantes expérimentales.

*

* *

La deuxième partie traite du mécanisme de la production d'acide acétique. Je me suis efforcé de répondre aux questions posées à propos des enzymes responsables de la transformation de l'éthanol en acide acétique.

En faisant agir des enzymes particulaires sur de l'éthanol radioactif en présence d'acétaldéhyde, on constate que la transformation d'éthanol en acétate passe par le stade acétaldéhyde, facilement échangeable, et que l'acétaldéhyde inhibe le fonctionnement de l'éthanol déshydrogénase particulaire. J'ai aussi constaté pour le système enzymatique particulaire, que l'acide acétique produit est inhibiteur compétitif de l'éthanol ; il intervient sous sa forme non dissociée ; de plus il entre en compétition avec les ions H^+ du milieu. L'inhibition par l'acide acétique est beaucoup plus élevée sur les enzymes particulaires que sur les cellules entières.

Comme pour l'éthanol, l'oxydation de l'acétaldéhyde par les enzymes particulaires montre deux constantes enzymatiques apparentes. L'acide acétique n'inhibe pas de façon compétitive son oxydation. Enfin j'ai constaté que lorsque le milieu s'appauvrit en oxygène, la réaction acétaldéhyde-acide acétique est arrêtée avant la réaction éthanol-acétaldéhyde.

En ce qui concerne la régulation des différentes déshydrogénases responsables de la transformation étudiée, il apparaît que les enzymes particulaires sont plus inductibles que les enzymes solubles liés au NAD ou NADP. Chez *Acetobacter mesoxydans* j'ai pu enfin isoler plusieurs types de déshydrogénases solubles liés respectivement au NAD et au NADP.

*

* *

La troisième partie est une contribution à l'explication de phénomène de la production d'acide acétique. On a en effet constaté que les bactéries acétiques oxydent l'éthanol en acide acétique et accumulent presque intégralement ce dernier dans le milieu de culture alors qu'elles sont capables de l'oxyder lorsque l'éthanol a complétement disparu. A différents pH les courbes de croissance observées présentent deux phases : au cours de la première phase, la faculté des cellules d'oxyder l'acétate est bien inférieure à celle observée lorsque l'éthanol a disparu du milieu de culture. L'acétate formé peut cependant servir de substrat carboné puisqu'on a pu suivre son incorporation dans les bactéries.

Le dosage des enzymes des cycles glyoxylique et tricarboxylique, au cours de l'adaptation des cellules à l'oxydation de l'acétate, a permis de montrer que la majorité des enzymes voient leur activité spécifique augmenter lorsque l'éthanol est remplacé par l'acétate dans le milieu de culture. Outre son action d'inhibition sur la synthèse des enzymes qui participent à l'oxydation de l'acétate, l'éthanol inhibe l'oxydation de l'acétate proprement dite par les cellules non proliférantes, cette inhibition est sensiblement constante pour une concentration d'éthanol comprise entre 7,5 mM/l et 300 mM/l.

BIBLIOGRAPHIE

ANDREWS J. F., 1968. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrats.
Biotechnol. Bioeng., 10, 707-723.

AIBA S., HUMPHREY A.E., MILLIS N.F., 1965. In "Biochemical Engineering", 75-106.
Acad. Press. New York.

ASAI T., 1934. Classification of acetic acid bacteria and oxidizing bacteria isolated form fruits. A new method of the classification of oxidizing bacteria.
J. Agric. Chem. Soc. Japan, 10, 621-9.

ASAI T., 1935. A systematic study of alcohol and carbohydrate-oxidizing bacteria isolated from fruits and a new classification of oxidizing bacteria.
J. Agric. Chem. Soc. Japan, 11, 50-60.

ASAI T., 1968. Acetic acid bacteria.
University Park Press, Baltimore.

ATKINSON D. E., 1956. The oxidation of ethanol and tricarboxylic acid cycles intermediates by *Acetobacter peroxydans*.
J. Bacteriol., 72, 195-98.

ATKINSON D. E., 1968. Citrate and the citrate cycle in the regulation of energy metabolism.
Biochim. Soc. Symp., 27, 23.

ATKINSON D. E., 1969. Regulation of enzyme fonction.
Ann. Rev. Microbiol., 23, 47-68.

BAETSLE R., 1950. Quelques observations sur l'alimentation des *Acetobacter*.
Bull. Techn. Vinaigrerie, 5, 108-10.

BAPTIST J. N., SHAW C. R., MANDEL M., 1969. Zone electrophoresis of enzymes in bacterial taxonomy.
J. Bacteriol., 99, 180-188.

BARKER F. B., SUMMERSON W. M., 1941. J. Biol. Chem., 138, 535.
d'après LEPAGE G. A. in "Manometric techniques", Burgess Publ. Co., 1951.

BAUCHOP T., ELSDEN S.R., 1960. The growth of micro-organisms in relation to their energy supply.
J. Gen. Microbiol., 23, 457-469.

BEGIN-HEICK N., HEICK H.M.C., 1970. The subcellular localization of alcohol dehydrogenase activities in *Astasia longa*.
Biochim. Biophys. Acta, 212, 13-20.

BENZIMAN M., 1969 a. Role of phosphoenolpyruvate carboxylation in *Acetobacter xylinum*.
J. Bacteriol., 98, 1005-1010.

BENZIMAN M., 1969 b. Malate dehydrogenase (FAD-linked) from *Acetobacter xylinum*.
In"Methods in Enzymology" Ed. by J. M. LOWENSTEIN, vol. XIII, 129-134. New-York Acad. Press Inc.

BERTHO A., 1932. Die Essiggärung.
Erg. der Enzymforsch., 1, 231-269.

BLACK S., 1951. Yeast aldehyde deshydrogenase.
Arch. Biochem. Biophys., 34, 86-97.

BUCHNER E., 1897. Alkoholische gärung ohne Hefezellen.
Ber, 30, 117.

BUCHNER E., MEISENHEIMER J., 1903. Enzymes fournies par les bactéries.
Ber, 36, 602-634.

BUCHNER E., GAUNT R., 1906. Eeber die Essiggärung.
Lieb. Ann., 349, 140-184.

BÜHNER M., SUND H., 1969. Yeast alcohol dehydrogenase : - SH groups, disulfide groups, quaterny structure, and reactivation by reductive cleavage of disulfide groups.
Eur. J. Biochem., 11, 73-79.

COHEN G., 1967. In "Le metabolisme cellulaire et sa régulation".
Hermann, Paris.

COZIC M., 1933. Etude biochimique de B. *xylinum*. Thèse. Ed. André Lescot, Nemours.

DANFORTH W. F., HUNTER F. R., 1966. Isocitrate dehydrogenases and NADP-alcohol dehydrogenases of *Euglena gracilis var. bacillaris*. J. Protozool., 13, 654-658.

DANIEL R. M., REDFEARN E. R., 1968. The reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase system of *Acetobacter suboxydans*. Biochem. J., 106 49-50.

DAVIS B. D., 1961. The teleonomic significance of biosynthetic control mechanisms. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 26, 1-10.

DAVIS B. J., 1964. Disc electrophoresis - II - Method and application to human serum proteins. Ann. N.-Y. Acad. Sci., 121, 404-427.

DEAN A.C.R., ROGERS P. L., 1967. The action of drugs on *Aerobacter aerogenes* in various systems of continuous culture. Biochim. Biophys. Acta, 148, 280-292.

DIVIES C., 1967. Comportement d'*Acetobacter rancens* en présence d'acétate D.E.S. Faculté des Sciences d'Orsay. Acad. PARIS.

DIVIES C., DUPUY P., 1969. Oxydation de l'acétate par *Acetobacter rancens*.
Ann. Technol. Agric., 18, 339-350.

DIVIES C., 1970 a. Cinétique de la fermentation acétique réalisée par *Acetobacter xylinum*.
Rev. Ferment. Industr. Alim., 25, 105-110.

DIVIES C., DUPUY P., 1970 b. Mise en évidence d'acétaldéhyde facilement échangeable au cours de l'oxydation de l'éthanol par les particules d'*Acetobacter rancens*.
C.R. Acad. Sci. Paris, 270, 1182-1184.

DIVIES C., 1970 c. Action du substrat carboné sur l'oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde par *Acetobacter aceti*.
Ann. Technol. Agric., 19, 187-196.

DIVIES C., 1972 a. Cinétique d'oxydation de l'éthanol et de l'acétaldéhyde par *Acetobacter mesoxydans*.
Ann. Technol. Agric., 21, 5-16.

DIVIES C., 1972 b. Mise en évidence de plusieurs alcool déshydrogénases liées respectivement au NAD et au NADP chez *Acetobacter mesoxydans*
C.R. Acad. Paris, 274, 334-336.

DIVIES C., 1972 c. Action de l'éthanol sur l'oxydation de l'acétate par *Acetobacter rancens*.
Biochimie, 54, 1073-1083.

DIXON G. H., KORNBERG H. L., 1962. Malate synthetase from Baker's yeast.
In "Methods in Enzymology". Ed. by S.P. COLOWICK and KAPLAN, vol. V, 633-637.
N.-Y. Acad. Press Inc.

DUPUY P., 1957. Les *Acetobacter* du vin. Identification de quelques souches.
Ann. Techn. Agr., 2, 217-233.

DUPUY P., 1958 a. Inhibition par l'acide sulfureux de l'oxydation de l'éthanol par *Acetobacter rancens*.
Thèse, Acad. Paris.

DUPUY P., 1958 b. Les conditions d'oxydation de l'acide acétique par *Acetobacter rancens*.
Ann. Techn. Agric., 4, 367-375.

DUPUY P., MAUGENET J., 1962. Oxydation de l'éthanol par *Acetobacter rancens*.
Ann. Techn. Agric., 11, 219-225.

EATON N. R., KLEIN H. P., 1954. The oxidation of glucose and acetate by *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Bacteriol., 68, 110-116.

EDWARDS V. H., 1970. The influence of high substrats concentrations on microbial kinetics.
Biotechnol. Bioeng., 12, 679-712.

EDWARDS V. H., GOTTSCHALD M. J., NOOJIN A. J., TUTHILL L. B., TANNAHILL A. L., 1970. Extended culture : the growth of *Candida utilis* at controlled acetate concentratio Biotechnol. Bioeng., 12, 975-999.

ENGLESBERG E., GIBOR A., LEWY J. B., 1954. Adaptative control of terminal respiration in *Pasteurella pestis*.
J. Bacteriol., 68, 146-151.

FALMAGNE P., VANDERWICKEL E., WIAME J. M., 1965. Mise en évidence de deux malate-synthétases chez *E. coli*
Biochim. Biophys. Acta, 99, 245-258.

FANSLER B., LOWENSTEIN J. M., 1969. Aconitase from Pig Heart.
In "Methods in Enzymology". Ed. by J. N. LOWENSTEIN, vol. XIII, 26-30.
N.-Y. Acad. Press Inc.

FRATEUR J., 1950. Essai sur la systématique des *Acetobacter*
La Cellule, 53, 287-392.

FRINGS H., 1932. U.S. Patent 1880, 381.
cité par VAUGHN, 1954.

FRINGS H., 1968. Procédé pour la fabrication de vinaigre par fermentation submergée de moûts alcooliques et appareillage pour la mise en oeuvre de ce procédé.
Brevet Français n° 1.517.846 (cl. C 12j).

GALZY P., SLONIMSKI P. P., 1955. Evolution de la constitution enzymatique de la levure cultivée sur acide lactique ou sur glucose comme seule source de carbone.
C.R. Acad. Sci. Paris, 245, 2556-2558.

GORDON A. H., GREEN D. E., SUBRAHMANYAN V., 1940. Liver aldehyde oxidase.
Biochem. J., 34, 764-74.

GOSLING J. P., DUGGAN P. F., 1971. Activities of tricarboxylic acid cycle enzymes, glyoxylate cycle enzymes, and fructose diphosphatase in baker's yeast during adaptation to acetate oxidation.
J. Bacteriol., 106, 908-914.

GRAY C. T., WIMPENNY W. T., MOSSMAN M.R., 1966. Regulation of metabolism in facultative bacteria.
II - Effects of aerobiosis, anaerobiosis and nutrition on the formation of Krebs cycle enzymes in *E. coli*.
Biochim. Biophys. Acta, 117, 33-41.

GREENFIELD S., CLAUS G. W., 1969. Isocitrate dehydrogenase and glutamate synthesis in *Acetobacter suboxydans*.
J. Bacteriol., 100, 1264-1270.

HANSON R. S., SRINIVASAN V. R., HALVORSON H. O., 1963. Biochemistry of sporulation. I - Metabolism of acetate by vegetative and sporulating cells.
J. Bacteriol., 85, 451-460.

HANSON R. S., BLICHARSKA J., ARNAUD M., SZULMAJSTER J., 1964. Observation on the regulation of the synthesis of the tricarboxylic cycle enzymes in *Bacillus subtilis*
Biochem. Biophys. Res. Commun., 17, 690-5.

HANSON R. S., COX D. P., 1967. Effect of different nutritional conditions on the synthesis of tricarboxylic acid cycle enzymes.
J. Bacteriol., 93, 1777-1787.

HATHAWAY J. A., ATKINSON D. E., 1965. Kinetics of regulatory enzymes : effect of adenosine triphosphate on yeast citrate synthase.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 20, 661-665.

HAYAISHI O., STANIER R. Y., 1951. The bacterial oxidation of tryptophan. III - Enzymic activities of cells-free extracts from bacteria employing the aromatic pathway.
J. Bacteriol., 62, 691-701.

HEICK H.M.C., WILLEMOT J., BEGIN-HEICK N., 1969. The subcellular localization of alcohol dehydrogenase activity in baker's yeast.
Biochem. Biophys. Acta, 191, 493-501.

HEICK H.M.C., BARRETTE M., 1970. Alcohol dehydrogenase activity in the yeast *Lipomyces starkevi*.
Biochim. Biophys. Acta, 212, 8-12.

HEMPFLING W.P., VISHNIAC W., 1967. Yield coefficients of *Thiobacillus neapolitanus* in continuous culture.
J. Bacteriol., 93, 874-878.

HINSHELWOOD C.N., 1952. In "The chemical kinetics of the bacteria cell".
Oxford Univ. Press, London.

HOLMS WH., BENNETT P.M., 1971. Regulation of isocitrate dehydrogenase activity in *E. coli* on adaptation to acetate.
J. gen. Microbiol., 65, 57-68.

HROMATKA O., EBNER H., 1949. Untersuchungen über die Essiggärung. I - Fesselgärung und Durchluftungverfahren.
Enzymologia, 13, 369-387.

HROMATKA O., EBNER H., 1950. Untersuchungen Uber die Essiggärung. II - Sauerstoffmangel du Fesselgärung.
Enzymologia, 14, 96-106.

HROMATKA O., EBNER H., 1951 a. Untersuchungen Uber die Essiggärung. III - Uber den Einfluss der Belütung auf die Submerse Gärung.
Enzymologia, 15, 57-69.

HROMATKA O., EBNER H., CSOKLICH C., 1951 b. Untersuchungen Uber die Essiggärung. IV - Uber den Einfluss Einer Vollstäudingen Unterbiedung der Belüftung auf die Submerse Gärung.
Enzymologia, 15, 134-153.

HROMATKA O., EBNER H., KASTMER G., 1953. Untersuchungen Uber die Essiggärung. V - Uber den Einfluss von Temperatur und Gesamt Konzentration auf die Submerse Gärung.
Enzymologia, 15, 337-350.

HURLBERT R. E., RITTENBERG S. C., 1962. Glucose metabolism of *Euglena gracilis var. bacillaris* ; growth and enzymatic studies.
J. Protozool., 9, 170-182.

JANKE A., 1962. Metabolism, taxonomy, and evolution of acetic acid bacteria.
Arch. Microbiol., 41, 79-114.

JONES M. E., LIPMANN F., 1955. Aceto-CoA-kinase
In "Methods in Enzymology." Ed. by S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN, vol. I, 585-591. N.-Y. Acad. Press Inc.

JÖRNVALL H., 1970. Horse liver alcohol dehydrogenase. The primary structure of the protein chain of the ethanol - active isoenzyme
Eur. J. Biochem., 16, 25-40.

KAPLAN N. O., 1963. I - Multiple forms of enzymes.
Bacteriol. Rev., 27, 155-69.

KEILIN D., HARTREE EF., 1948.
Biochem. J., 42, 220 et 230, d'après STA[illegible] A[illegible] (1963).

KERSTERS K., de LEY J., 1966 a. Primary and secondary alcohol dehydrogenases from *Gluconobacter*. In "Methods in Enzymology", Ed. by A. WOOD, vol. IX, 346-354. Acad. Press. N.-Y.

KERSTERS K., de LEY J., 1966 b. Polyol dehydrogenases of *Gluconobacter*. In "Methods in Enzymology", Ed. by W.A. WOOD, vol. IX, 170-179. N.-Y. Acad. Press. Inc.

KIDA M., ASAI T., 1968. In "Acetic acid bacteria" by ASAI T. University Park Press, Baltimore, 133-135.

KING T.E., CHELDELIN V.H., 1954. Oxidation in *Acetobacter suboxydans*. Biochim. Biophys. Acta, 14, 108-116.

KING T.E., CHELDELIN V.H., 1956. Oxidation of acetaldehyde by *Acetobacter suboxydans*. J. Biol. chem., 220, 177-191 .

KING T.E., 1966. Glucose dehydrogenases - particulate. II - *Acetobacter suboxydans*. In "Methods in Enzymology". Ed. by W.A. WOOD vol. IX, 98-103. New-York Acad. Press Inc.

KORNBERG H. L., 1961. Selective utilisation of metabolic routes by *E. coli*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 26, 257-259

KORNBERG H. L., ELSDEN S. R., 1961. The metabolism of 2-carbon compounds by microorganisms. Advan. Enzymol., 23, 401-70.

KORNBERG H. L., 1966. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli* Biochem. J., 99, 1-11.

KÜTZING F., 1837. J. prakt. Chem., 11, 385, d'après VAUGHN (1954).

LAYNE E., 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In "Methods in Enzymology". Ed. by S.P. COLOWIC N.O. KAPLAN, vol. III, 447-454. New-York Acad. Press Inc.

LEIFSON E., 1954. The flagellation and taxonomy of species of *Acetobacter*. Antonie van Leeuwenhoek, 20, 102.

LEISINGER Th., 1965. Untersuchungen zu Systematik und Stoffwechsel der Essigsaürebakterien. Thèse Univ. Zürich.

de LEY J., SCHELL J., 1959. Studies on the metabolism of *Acetobacter peroxydans*. II - The enzymic mechanism of lactate metabolism. Biochim. Biophys. Acta, 35, 154-165.

de LEY J., 1961. Comparative carbohydrate metabolism and a proposal for a phylogenetic relation ship of the acetic acid bacteria. J. Gen. Microbiol., 24, 31.

de LEY J., SCHELL J., 1962.
J. Gen. Microbiol., 29, 589, cité par ASAI (1968).

LIAO C. L., ATKINSON D. E., 1971. Reglulation at the phosphoenolpyruvate branchpoint in *Azotobacter vinelandii* : phosphoenolpyruvate carboxylase.
J. Bacteriol., 106, 31-36.

LIAO C. L., ATKINSON D. E., 1971. Regulation at the phosphoenolpyruvate branchpoint in *Azotobacter vinelandii* : Pyruvate kinase.
J. Bacteriol., 106, 37-44.

LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J., 1951. Protein measurment with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275.

LUBOCHINSKY B., ZALTA J., 1954. Microdosage colorimétrique de l'azote ammoniacal.
Bull. Soc. Chim. Biol., 36, 1363-66.

LUEDEKING R., PIRET E. L., 1959. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH.
J. Biochem. Microbiol. Techn. Eng., I, 393-412.

LURIA S. E., 1960. In "The bacteria", vol. I, The bacterial protoplasm : composition and organisation.
Ed. I. C. GUNSALUS and R. Y. STANIER.
New-York Acad. Press Inc.

LUTSTORF U., MEGNET R., 1968. Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. I - Physiological control of ADH-2 and properties of ADH-2 and ADH-4.
Arch. Biochem. Biophys., 126, 933-944.

MARAGOUDAKIS M. E., SEKIZAWA Y., KING T. E., CHELDELIN V. H., 1966. Glutamate bioxynthesis in *Acetobacter suboxydans*. VI - Formation from acetate plus pyruvate.
Biochemistry, 5, 2646-2653.

MARAGOUDAKIS M. E., STRASSMAN M., 1967. Biosynthesis of α-isopropylmalic and citric acids in *Acetobacter suboxydans*
J. Bacteriol., 94, 512-516.

MARR J. J., WEBER M. M., 1968. Studies on the mechanism of purine nucleotide inhibition of a triphospho-pyridine nucleotide-specific isocitrate dehydro-genase.
J. Biol. Chem.; 243, 4973-79.

MAUGENET J., 1962. Les *Acetobacters* du cidre. Identifica-tion de quelques souches.
Ann. Technol. Agric., 11, 45-53.

Mc ILWAIN H., 1948. Preparation of cell-free bacteria extracts with poxdered alumina.
J. Gen. Microbiol., 2, 288-91.

MONARD D., HUTTER R., ETTLINGER L., 1967. Auxotrophie dictée par la source d'énergie chez *A. aceti*.
Path. Microbiol., 30, 966-71.

MONARD D., 1968. Contribution à l'étude du métabolisme d'*Acetobacter aceti*.
Thèse Univ. Zürich.

MONOD J., 1950. La technique du culture continue, théorie et applications.
Ann. Inst. Pasteur, 79, 390-410.

MOR J. R., FIECHTER A., 1968. Continuous cultivation of *Saccharomyces cerevisiae*. II - Growth on ethanol under transient-state conditions.
Biotechnol. Bioeng., 10, 787-803.

MORI A., KONNO N., TERUI G., 1970. Kinetic studies on submerged acetic acid fermentation.
I - Behaviors of *Acetobacter rancens* cells toward dissolved oxygen.
J. Ferment. Technol., 48, 203-212.

MURRAY J., 1971. Liquid scintillation counting of $^{14}CO_2$ in a toluene/triton X-100 system.
Int. J. Appl. Radiat. Isotopes, 22, 209.

NAKAYAMA T., 1960. Studies on acetic acid bacteria.
II - Intracellular distribution of enzymes related to acetic acid fermentation and some properties of a highly purifies TNP dependant aldehyde dehydrogenase.
J. Biochem., 48, 812-830.

NAKAYAMA T., 1961 a. III - Purification and properties of coenzymes - independant aldehyde dehydrogenase.
J. Biochem., 49, 158-163.

NAKAYAMA T., 1961 b. Studies on acetic acid bacteria IV - Purification and properties of a new type alcohol dehydrogenase, alcohol - cytochrome - 553 reductase.
J. Biochem., Tokyo, 49, 240-251.

NEUBERG C., NORD F., 1919. Festlegung der Aldehystufe bei der Essiggärung
Biochem. Z., 96, 158-174.

PAIGEN K., WILLIAMS B., 1970. Catabolite repression and other control mechanisms in carbohydrate utilisation.
In"Advances in Microbial physiology". Ed. by A. H. ROSE and J. F. WILKINSON. New-York Acad. Press Inc.

PASTEUR L., 1868. Etudes sur le vinaigre. Oeuvres III, MASSON, Paris, 1922.

PIETRUSZKO R., RINGOLD H. J., LI T. K., VALLEE B. L., AKESON A., THEORELL H., 1969.
Structure and function relationships in isozymes of horse liver alcohol dehydrogenase.
Nature, 221, 440-443.

PIRT S. J., 1965. The maintenance energy of bacteria in growing cultures.
Proc. Rov. Soc., 163, 224-231.

PLANT, 1970. DPN-linked isocitrate dehydrogenase of animal tissues. In "Current topics in cellular regulation". Ed. by L. HORECKER and E. R. STADTMAN, II, 1-27. New-York Acad. Press Inc.

PRIEUR P., 1957. Présence de deux systèmes d'oxydation de l'éthanol dans A. *xylinum*.
C.R. Acad. Sci. Paris, 244, 253-55.

PRIEUR P., 1960. Présence de deux systèmes d'oxydation de l'acétaldéhyde en acide acétique dans A. *xylinum*.
C.R. Acad. Sci. Paris, 250, 1733-35.

POLAKIS E. S., BARTLEY W., 1965. Changes in the enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic growth on different carbon sources.
Biochem. J., 97, 284-297.

RACKER E., 1955. Alcohol dehydrogenase from baker's yeast In "Methods in enzymology" Ed. by S. P. COLOWICK and N. O. KAPLANT, vol. I. 500-503 New-York Acad. Press Inc.

RAINBOW C., 1966. Nutrition and metabolism of acetic bacteria.
Wallerstein Lab. Communic., 98, 5-15.

RAO M.R.R., GUNSALUS J.C., 1955.
Feder. Proc., 14, 267, citée par ASAI (1968).

RAO M.R.R., 1955. Pyruvate and acetate metabolism in *Acetobacter suboxydans* and *Acetobacter aceti*.
Thesis Univ. Illinois.

RAMKRISHNA D., FREDRICKSON A. G., TSUCHIYA H. M., 1967. Dynamics of microbial propagation : Models considering inhibitors and variable cell composition.
Biotechnol. Bioeng., 9, 129-170.

REED L. J., WILLMS C.R., 1966. Purification and resolution of the pyruvate dehydrogenase complex (*E. coli*). 247-265.
In "Methods in Enzymology", Ed. by W.A. WODD, vol. IX, 247-265. New-York, Acad. Press. Inc.

RICHARDSON K. C., 1967. Submerged acetification of a vinegar base. Produced from wastes pineapple juice.
Biotechnol. Bioeng., 9, 171-86.

ROTENBACH, EBERLIN, 1905.
Deutsch Essigindustri Wochenschrift, 9, 233.

SANWAL B. D., 1970. Allosteric controls of amphibolic pathways in bacteria.
Bacteriol. Rev., 34, 20-39.

SCHIMPFESSEL L., 1968. Présence et régulation de la synthèse de deux alcool-déshydrogénases chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.
Biochem. Biophys. Acta, 151, 317-329.

SCHULTZ J. S., GADEN F. L., 1956. Sulfite oxidation as a mesure of aeration effectiveness.
Ind. and Eng. Chem., 48, 2209-2216.

SCHÜZENBACH, 1823. d'après Vaughn (1954).

SEEGMILLER J. E., 1955. TNP-linked aldehyde dehydrogenase from yeast.
In "Methods in Enzymology". Ed. by S.P. COLOWICK and N. O. KAPLAN, vol. I, 511-514. New-York, Acad. Press Inc.

SEKIZAWA Y., MARAGOUDAKIS M. E., KING T. E., CHELDELIN V. H., 1966. Glutamate biosynthesis in an organism lacking a Krebs tricarboxylic acid cycle. V - Isolation of α-hydroxy- α-ketoglutarate (HKG) in *Acetobacter suboxydans*. Biochemistry, 5, 2392-2398.

SELEGNY E., BROUN G., THOMAS D., 1969. Enzymes en phase insoluble. Variation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration en substrat. Effets dits "régulateurs" des membranes enzymatiques. C.R. Acad. Sci. Paris, D, 269, 1330-1333.

SIGGIA D., 1963. In "Quantitative organic analysis". John WILLEY ans sons, Inc, p. 119.

SJOGREN R. E., ROMANO A. H., 1967. Evidence of multiple forms of isocitrate lyase in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol., 93, 1638-1643.

SMITH R. A., GUNSALUS I. C., 1955. Distribution and formation of isocitritase. Nature, 175, 774.

SRERE P. A., 1969. Citrate synthase In"Method in Enzymology" Ed. by J.M. LOWENSTEIN vol. XIII, 3-11. New-York Acad. Press Inc.

STANIER R. Y., 1947. Acetic acid production from ethanol by *Fluorescent Pseudomonas*. J. Bacteriol., 54, 191.

STAUB A. M., 1963. In "Techniques de Laboratoire". Masson, Paris, 1309-1366.

STOUTHAMER A. H., 1960. Koohlhydraatstofursseling van de Azynzurbacteriën. Thesis, Univ. Utrecht.

STOUTHAMER A. H., Van BOOM J. H., BASTIAANSE A. J., 1963. Metabolism of C_2 compounds in *Acetobacter aceti*. Antomie Van Leeuwenhoek, 29, 393-406.

TAMIYA H., TANAKA K., 1930. Zur physiologie der Essiggärung. Acta phytochimica, 5, 167-211.

TANNENBAUM S., 1956. The metabolism of A. *peroxydans*. Biochim. Biophys. Acta, 21, 335-349.

TRUCHET R., 1948. In "Traité de Chimie organique", par GRIGNARD, vol. IX, 1-92, Masson et Cie, Paris.

THEORELL H., BONNICHSEN R., 1951. Studies on liver alcohol dehydrogenase. I - Equilibria and initial reaction velocities. Acta Chem. Scand., 5, 1105-1126.

TANIGUCHI S., THEORELL H., ASESON A., 1967. Dissociation constants of the binary complex of homogeneous horse liver alcohol dehydrogenase and nicotinamide adenine dinucleotide. Acta. Chem. Scand., 21, 1903-20.

UMBARGER H. E., 1954. The influence of the environnement on acetate metabolism in *E. coli*. J. Bacteriol., 68, 140-145.

UMBREIT W. W., BURRIS R. H., STAUFFER J. F., 1949. Manometric techniques and tissus metabolism. Burgess Publ. Ca.

URSPRUNG H., CARLIN L., 1968. *Drosophila* alcohol dehydrogenase in vitro changes of isozyme patterns. Ann. N.-Y. Acad. Sci., 151, 456-475.

VAUGHN R. H., 1954. Acetic acid-Vinegar. In "Industrial Fermentation" Ed. by L.A. Underkofler, R.J. Hickey. Chemical Publishing Co. Inc. New-York.

VEEGER C., Der VARTANIAN D. V., ZEYLEMAYER W. P., 1969. Succinate dehydrogenase, In "Methods in Enzymology". Ed. by J. M. LOWENSTEIN, vol. XIII, 81-90. New-York Acad. Press Inc.

VISSER'T HOOFI, 1925. Biochemische anderzvekinger over hit geslacht *Acetobacter*. Diss. Delft. cité par FRATEUR (1950).

WEITZMAN P.D.J., JONES D., 1968. Regulation of citrate synthase and microbial taxonomy. Nature, 219, 270-272.

WEITZMAN P.D.J., 1969. Citrate synthase from *E. coli*, p. 22-26.
In "Methods in Enzymology". Ed. by J.M. LOWENSTEI vol. XIII, 22-26. New-York Acad. Press Inc.

WIAME J.M., 1965. La régulation d'embranchements métaboliques.
In "Mécanisme de régulation des activités cellulaires chez les microorganismes".
Ed. C.N.R.S. Paris, p. 381-398.

WIELAND H., BERTHO A., 1928. Uber den mechanism der Oxydationsvorgänge.
Lieb. Ann., 467, 95-158.

WILLIAMS P.J.B., RAINBOW C., 1964. Enzymes of the tricarboxylic acid cycle in acetic acid bacteria.
J. Gen. Microbiol., 35, 237-247.

WILLIAMSON J.R., SCHOLZ R., BROWNING E.T., THURMAN R.G., FUKAMI M.H., 1969. Metabolic effects of ethanol in perfused rat liver.
J. Biol. Chem., 244, 5044-54.

WITT I., KRONAN R., HOLZER H., 1966. Repression von Alkoholdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitrathyase und Malatsynthase in Hefe durch glucose.
Biochim. Biophys. Acta, 118, 522-527.

WYSS A., ETTLINGER L., 1969. Coenzyme linked dehydrogenase of acetic acid bacteria.
Pathol. Microbiol., 34, 148.

YANO T., KOGA D., 1969. Dynamic behavior of the chemostat subject to substrate inhibition.
Biotechnol. Bioeng., 10, 139-153.

ZINK M. W., 1969. Regulation of NAD-specific alcohol dehydrogenases in *Neurospora crassa*. Can. J. Microbiol., 15, 265-271.